

**UNTERSUCHUNGEN ZUR TEMPERATURSTABILITÄT VON
4070A MLV UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER
VIRUS/ZELL INTERAKTIONEN**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von Christiane Beer
aus Magdeburg

1. Referent: Prof. Dr. J. Bode

2. Referent: Prof. Dr. J. Wehland

eingereicht am: 06.09.2001

mündliche Prüfung (Disputation) am: 25.01.2002

2002 (Druckjahr)

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Beer C., Meyer A., Müller K. and Wirth M., The temperature stability of mouse retroviruses depends on the cholesterol levels of viral lipid shell and cellular plasma membrane. Hum. Gene Ther. (submitted)

Cruz P.E., Goncalves D., Merten O.-W., Wirth M., Fiamma-Geny C., Beer C., Coroadinha A.S., Teixeira M., Danos O. and Carrondo M.J.T., Evaluation of retroviral properties using Electron Paramagnetic Resonance (EPR): a focus on temperature stability. Biotech.Bioeng. (submitted)

Tagungsbeiträge

Beer C., Müller K. and Wirth M., Modulation of the physicochemical stability of mouse retroviral vectors. The 7th meeting of the European Society of Gene Therapy (ESGT), München 1999. J. Gene Med., supplement to volume 1 (6), Poster 17 (1999)

Beer C., Müller K. and Wirth M., Modulation of the physicochemical stability of mouse retroviral vectors. Third international Cancer Gene Therapy Meeting, Paris 2000. Abstracts of poster discussions. Cancer Gene Ther. 7 (10): 1390-1407 (2000)

Beer C., Müller K. and Wirth M., The physicochemical stability of mouse retroviruses depends on the packaging cell line and the temperature of production. The 8th meeting of the European Society of Gene Therapy (ESGT), Stockholm 2000. J. Gene Med. 2 (5 suppl.): 1-123 (2000)

Cruz P.E., Goncalves D., Coroadinha A.S., Teixeira M., Merten O.-W., Beer C., Wirth M., Carrondo M.J.T., Study of the stability of retroviruses with different envelopes produced in mouse and human cell lines in different culture conditions. Poster P4.102, The 17th meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Tylösand 2001

INHALTSVERZEICHNIS**INHALTSVERZEICHNIS**

ZUSAMMENFASSUNG	1
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>3</u>
1.1 RETROVIREN	4
1.1.1 Aufbau der retroviralen Partikel	4
1.1.2 Das retrovirale Genom	5
1.1.3 Der Replikationszyklus	6
1.2 PRODUKTION UND STABILITÄT RETROVIRALER VEKTOREN	10
1.3 CHOLESTERIN	14
1.3.1 Bedeutung des Cholesterins für eukaryotische Zellen	14
1.3.2 Caveolae und Rafts	15
1.3.3 Cholesterinstoffwechsel	17
1.3.3.1 Regulation der Cholesterinbiosynthese	20
1.3.4 Einfluß des Cholesterins auf den viralen Lebenszyklus	21
1.4 AUFGABENSTELLUNG	22
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>23</u>
2.1 MATERIAL	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Verbrauchsmaterial	24

2.2	CHEMIKALIEN	24
2.2.1	Puffer und Lösungen	25
2.2.2	Medien und Seren	26
2.2.3	Selektionsagentien	26
2.3	EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	26
2.4	<i>E. COLI</i> STÄMME	27
2.5	VERWENDETE COMPUTERPROGRAMME	27
2.6	VERWENDETE MASSENSTANDARDS	27
2.6.1	Proteine	27
2.6.2	DNA	27
2.7	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	28
2.7.1	Arbeiten mit <i>E.coli</i>	28
2.7.1.1	Kultivierung von Bakterien	28
2.7.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektrotransformation	28
2.7.1.3	Transformation von <i>E.coli</i>	29
2.7.2	Arbeiten mit DNA	29
2.7.2.1	DNA-Minipräparation	29
2.7.2.2	DNA-Maxipräparation	30
2.7.2.2.1	Qiagen Plasmid Maxi Purification Kits	30
2.7.2.2.2	CsCl-Gradient	30
2.7.2.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	31
2.7.2.4	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	32
2.7.2.5	DNA-Restriktionsspaltungen	32
2.7.2.6	Gelelektrophorese	33

2.7.3	Arbeiten mit RNA	33
2.7.3.1	RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellkulturen	33
2.7.3.2	DNA-Verdau zur Entfernung von DNA-Kontaminationen aus RNA-Lösungen	34
2.7.3.3	Entfernung von DNase I aus RNA-Lösungen	34
2.7.4	Gen-Expressionsanalyse	35
2.7.4.1	ATLAS, Clontech	35
2.7.4.1.1	cDNA-Synthese	35
2.7.4.1.2	Aufreinigung der synthetisierten cDNA	36
2.7.4.1.3	Hybridisierung der cDNA	37
2.7.4.1.4	Auswertung des Microarrays	37
2.8	ARBEITEN MIT PROTEINEN	38
2.8.1	SDS-PAGE	38
2.8.1.1	Probenaufarbeitung	38
2.8.1.2	Proteingel	38
2.8.2	Western Blot	39
2.8.3	DOT BLOT	40
2.8.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
2.8.5	Antikörperproduktion	41
2.9	ARBEITEN MIT EUKARYOTISCHEN ZELLKULTUREN	42
2.9.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellkulturen	42
2.9.2	Passagieren der Zellen	42
2.9.3	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellkulturen	42
2.9.4	Auftauen von Zellen	43
2.9.5	Transfektionsmethoden	43
2.9.5.1	Calciumphosphat-Methode	43
2.9.5.2	Selektion auf stabile Klone	43

2.9.6	ARBEITEN MIT RETROVIREN	44
2.9.6.1	Produktion	44
2.9.6.2	Aufkonzentrierung	44
2.9.6.3	Titerbestimmung	45
2.9.6.4	Stabilitätsuntersuchungen	46
2.9.6.5	Berechnungen der viralen Halbwertszeiten	46
2.9.6.6	Bestimmung der Anzahl physischer retroviraler Partikel	46
2.9.6.6.1	Realtime-PCR	46
2.9.6.6.1.1	Analyse der retroviralen strong-stop cDNA	47
2.9.6.6.2	Virusfärbung	47
2.9.6.6.2.1	Immunhistochemische Envelope-Färbung	48
2.9.6.6.2.2	Färbung der viralen Membranen	48
2.9.6.6.2.3	Quantifizierung gefärbter Retroviren	49
2.9.6.7	Färbung der Virusbindung an Zelloberflächen	49
2.9.6.7.1	Immunhistochemische Färbung der Bindung von Viren an Zelloberflächen	49
2.9.6.7.2	Virusbindung mit Filipin gefärbten Viren	50
2.9.6.8	Bestimmung der Proteaseaktivität in Zellkulturüberständen	50
2.9.6.9	Fluoreszenzdurchflußcytometrie	51
2.10	ARBEITEN MIT CHOLESTERIN	51
2.10.1	Enzymatische Cholesterinbestimmung des zellulären Cholesteringehaltes	51
2.10.2	Bestimmung des Cholesteringehaltes retroviraler Membranen	52
2.10.3	Färbung von zellulärem Cholesterin mit Filipin	52
2.10.4	Cholesterinextraktion aus viralen Membranen	53
2.10.5	Cholesterinextraktion aus Zellmembranen	54
2.10.6	Untersuchungen der Raft-Assoziierung von Proteinen	54
2.11	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	55

3	ERGEBNISSE	56
3.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT DES AMPHOTROPEN	
	4070A MLV	57
3.1.1	Beeinflussung der Produktion und Stabilität von 4070A MLV durch die Produktionszelle	57
3.1.1.1	Generierung eines Helfervirussystems zur Produktion von 4070A MLV	58
3.1.1.2	Einfluß der Zelle auf die Produktion von 4070A MLV	60
3.1.1.2.1	Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung retroviraler Partikel	62
3.1.1.2.2	Nachweis des Envelope-Proteins auf der Oberfläche von 4070A MLV	65
3.1.1.3	Untersuchungen des Einflusses der Produktionszelle auf die physikochemische Stabilität von 4070A MLV	68
3.1.1.4	Bestimmung der Proteaseaktivität 4070A MLV haltiger Zellkulturüberstände	71
3.1.2	Einfluß der Produktionstemperatur auf die Produktion und Stabilität von 4070A MLV	72
3.1.2.1	Einfluß auf die Produktion von 4070A MLV	72
3.1.2.2	Einfluß auf die Stabilität der 4070A MLV	75
3.2	ANALYSEN DER PRODUKTIONSZELL/RETROVIRUS	
	INTERAKTIONEN	76
3.2.1	Einfluß der Kultivierungstemperatur auf Produktionszelle und Virusstabilität	77
3.2.1.1	Änderung des Cholesteringehaltes von Zellen durch die Kultivierung bei 32°C	80
3.2.1.2	Einfluß des Cholesteringehaltes der zellulären Plasmamembran auf den Cholesteringehalt der viralen Membran	82
3.2.1.3	Einfluß des Cholesteringehaltes auf die virale Stabilität	84
3.2.2	Bedeutung des Cholesterins für den Lebenszyklus der 4070A MLV	90
3.2.3	Einfluß der Virusbildung auf die Produktionszelle	96

4 DISKUSSION 100

4.1	Die Produktion von 4070A MLV ist abhängig von der Produktionszelllinie	102
4.2	Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung umhüllter Viren	103
4.3	Die Inaktivierungskinetik von 4070A MLV ist abhängig von der Lagerungstemperatur	105
4.4	Die Produktionstemperatur beeinflusst die Stabilität von 4070A MLV	106
4.5	Erhöhte Cholesterinkonzentration in der viralen Membran verringert die thermische Stabilität von 4070A MLV	107
4.6	Cholesterinreiche Mikrodomänen haben eine weitreichende Bedeutung für den viralen Lebenszyklus	110
4.7	Einfluß der Virusproduktion auf die Produktionszelllinie	113
4.8	Ausblick	117

5 ANHANG 118

5.1	Abkürzungen	118
5.2	Plasmide	121
5.3	Primer	122
5.4	Antikörper	122
5.5	Literatur	123

DANKSAGUNG 134

ZUSAMMENFASSUNG

Für den Einsatz retroviraler Vektoren in der Gentherapie werden pro Dosis bis zu 10^{14} infektiöse Retroviren benötigt. Die Herstellung erfordert aufgrund der relativ geringen Bildungsrate der Produktionszelllinien einen erheblichen Produktions- und Aufarbeitungsaufwand. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine Kultivierung der Verpackungszelllinien bei 32°C im Vergleich zu 37°C zu einem höheren viralen Titer führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, daß durch die Inkubation der Produktionszellen bei 32°C bzw. 37°C qualitativ unterschiedliche Retroviren (4070A MLV) entstehen. Es wurde festgestellt, daß die Herabsetzung der Kultivierungstemperatur auf 32°C bei NIH3T3 und TE671 basierten Verpackungszelllinien zur zwei- bis dreifachen Reduktion der thermischen Stabilität der freigesetzten 4070A MLV's führt. Mit Hilfe von Microarray basierten Genexpressionsprofilen konnte nachgewiesen werden, daß es aufgrund der Temperatursenkung, zu einer massiven Änderung des Genexpressionsmusters der Produktionszellen kommt. Bei der Auswertung des Arrays galt das Hauptaugenmerk Genen, deren abweichende Expression einen Einfluß auf die Membranzusammensetzung der Zelle und somit auch auf die viralen Stabilitätseigenschaften haben könnte. So konnten mehrere Gene mit einer veränderten Expressionstärke identifiziert werden, die an der Cholesterinbiosynthese und der Aufrechterhaltung des Cholesteringehaltes der Zelle beteiligt sind. Die Analyse des Cholesteringehaltes von Produktionszellen und gebildeten 4070A MLV's ergab, daß die Senkung der Kultivierungstemperatur auf 32°C eine 1,4 fache Erhöhung der Cholesterinkonzentration in der zellulären Plasmamembran und eine 3,4 fache Zunahme in der viralen Membran verursacht. Durch den Vergleich der Cholesterinkonzentration der Produktionszelle und der viralen Halbwertszeit konnte indirekt gezeigt werden, daß zwischen der Zunahme des Cholesteringehaltes in der Membran der Produktionszellen und der Abnahme der Stabilität der gebildeten Retroviren ein linearer Zusammenhang besteht. Durch die *in vitro* Depletion des Cholesterins aus der Membran der 4070A MLV's mit Hilfe von Methyl- β -Cyclodextrin war es möglich, die thermische Stabilität der Viren um das vier- bis zwölffache zu erhöhen. Damit konnte nachgewiesen werden, daß die Cholesterinkonzentration der Membran von 4070A MLV's und die Geschwindigkeit der viralen Inaktivierung in direktem Zusammenhang stehen.

Neben der Kultivierungstemperatur hat auch die verwendete Produktionszelllinie einen entscheidenden Einfluß auf die thermische Stabilität der gebildeten Retroviren, was auf die Va-

riabilität im Cholesteringehalt der zellulären Plasmamembran zurückzuführen ist. So lassen sich die untersuchten Zelllinien nach der Stabilität der 4070A MLV's wie folgt ordnen: TE FlyA7 (Mensch) > BHK-A/BHK21B (Hamster) > NIH3T3 (Maus).

Die Zelllinie bestimmt auch die Höhe der Produktion und den Anteil infektiöser Viren. So produzieren z.B. NIH3T3 1000 und 7500 mal mehr infektiöse 4070A MLV's als die Hamsterzelllinien BHK-A und BHK21B. Durch die Quantifizierung viraler Partikel konnte gezeigt werden, daß die Zelllinien trotz der geringeren Titer vergleichbare Mengen physischer viraler Partikel bilden und somit über das Potential einer effizienten Produktionszelllinie verfügen.

Für die Quantifizierung viraler Partikel wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt. Dieses Verfahren ist antikörperunabhängig und beruht auf der Markierung von Cholesterinmolekülen der viralen Membran mit Filipin. Durch die Fluoreszenzeigenschaften dieses Polyen-Makrolid-Antibiotikums können prinzipiell alle Viren mit einer cholesterinhaltigen Hülle im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Neben dem Einfluß auf die Stabilitätseigenschaften der Viren hat das Cholesterin auch weitreichende Bedeutung für den Zusammenbau- und Freisetzungs- sowie für den Infektionsprozeß der 4070A MLV's. Mit der vorliegenden Arbeit liegen erstmals Hinweise vor, nach denen die Rafts und Caveolae die Orte des Zusammenbaus und der Freisetzung von 4070A MLV's sind. Damit ergeben sich neue Erkenntnisse für den bisher kaum verstandenen Prozeß des Zusammenbaus der viralen Partikel. Gleichzeitig sind die Rafts und Caveolae auch erstmalig als die Bereiche der Membran identifiziert worden, in denen die Infektion der Zelle durch 4070A MLV's erfolgt.

Um neue Erkenntnisse für die Produktion von retroviralen Vektoren zu gewinnen, wurden mit Hilfe von Microarray-Analysen die Interaktionen zwischen Zelle und Virus analysiert. Durch diese Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Wechselwirkungen äußerst komplexer Natur sind und die Bildung der Viren einen weitreichenden Einfluß auf verschiedenste zelluläre Prozesse, wie die Signaltransduktion und die Ausbildung von Intermediärfilamenten hat. Bei 4070A MLV produzierenden NIH3T3 konnte gezeigt werden, daß die Produktion der Viren die Umstrukturierung der Desminfilamente, einem Bestandteil der Intermediärfilamente der Zelle, verursacht.

1 EINLEITUNG

Retroviren standen von jeher im Blickpunkt intensiver Forschungsarbeiten. Der Grund hierfür liegt zum einen in ihrer Bedeutung als Krankheitserreger (z.B. HIV) und zum anderen in ihrem potentiellen Einsatz für gentherapeutische Applikationen (z.B. MLV). 1994 wurden in 55 von 72 gentherapeutischen Verfahren, die die klinische Phase erreichten, retrovirale Vektoren eingesetzt [1]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden für 61% aller durchgeführten Gentherapien Retroviren verwendet [2]. Einige der viralen Eigenschaften, wie die stabile Integration des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle und die Fähigkeit, eine Vielzahl unterschiedlichster Zelltypen infizieren zu können, machen die Retroviren dabei für diese Einsätze so interessant.

Diesen vorteilhaften Merkmalen stehen jedoch andere Charakteristika gegenüber, welche die Produktion retroviraler Vektoren für eine weitreichende klinische Anwendung zur Zeit noch erschweren. Einige der Probleme sind die Bildung replikationskompetenter Viren und die Produktion relativ geringer Titer bei gleichzeitiger Instabilität der viralen Partikel. Dies stellt gerade für den Einsatz für *in vivo* Applikationen einen Nachteil dar. Durch genetische Modifikationen der Viren und verbesserte Verpackungszelllinien, aber auch durch die Optimierung der Produktion von retroviralen Vektoren versucht man die nachteiligen Eigenschaften der Retroviren zu umgehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden u.a. die Interaktionen zwischen Virus und Wirts- bzw. Produktionszelle näher untersucht, um auf Basis dieser Untersuchungen verbesserte Produktions- und Vektorsysteme zu entwickeln.

1.1 RETROVIREN

1.1.1 AUFBAU DER RETROVIRALEN PARTIKEL

Retroviren sind ungefähr 100 nm große Partikel und zählen zu den umhüllten Viren, die neben dem Viruskapsid über eine weitere Hülle verfügen (siehe Abbildung 1.1). Auf dieser viralen Membran, die sich von der Plasmamembran der Wirtszelle ableitet, präsentiert das Virus die Envelope-Proteine, die für die Infektion wichtig sind.

Diese sogenannten Envelope-Proteine bestehen aus zwei Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken aneinander gebunden sind [3]. Eine der Untereinheiten, das Surface-Protein (SU), vermittelt die Bindung an die Rezeptoren und damit die Wirtsspezifität der Retroviren. Viren, die nur aus der Maus stammende Zellen infizieren können, werden als ecotrope Viren bezeichnet, während die Retroviren, deren Wirtsspezifität nicht ausschließlich auf Mauszelllinien beschränkt ist, als amphotrope Retroviren bezeichnet werden. Die zweite Untereinheit, das Transmembran-Protein (TM), ist in der Membran verankert und spielt eine wichtige Rolle bei der Umhüllung der viralen Partikel mit der Membran der Wirtszelle. Ein Teil der TM-Untereinheit, das sogenannte R-Peptid, ist für die Fusion des Virus mit der Wirtszelle wichtig und somit für den Infektionsprozeß von entscheidender Bedeutung (siehe Abschnitt 1.1.3).

Zwischen viraler Membran und Kapsid ist das Matrix-Protein lokalisiert, dem wie dem Transmembran-Protein eine Funktion beim Viruszusammenbau zugeordnet wird.

Das virale Kapsid wird von dem hydrophoben Kapsid-Protein (CA) gebildet. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheint das Kapsid als pleomorphe Struktur, das bedingt ikosaedrale symmetrische Strukturen aufweist [4, 5].

Innerhalb des viralen Kapsids sind zwei Moleküle der genomischen RNA und einige virale Enzyme, wie die reverse Transkriptase und die virale Protease, lokalisiert. Der Aufbau und die Struktur des Virusgenoms sind in Abschnitt 1.1.2 erläutert. Das virale RNA-Genom wird von dem sogenannten Nukleoprotein gebunden und so möglicherweise stabilisiert. Die Phosphorylierung und Bindung dieses Proteins an die RNA scheinen eine wichtige Rolle bei dem Zusammenbau und dem Abbau der Virionen zu spielen [6].

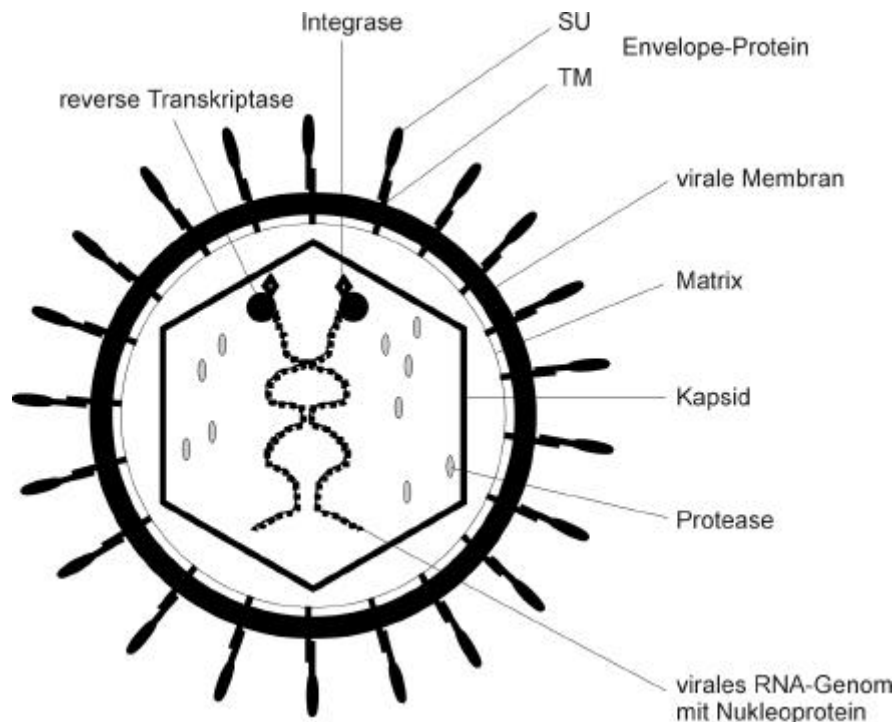


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines retroviralen Partikels, nach Coffin et al. [3]; (SU – Surface Untereinheit des Envelope-Proteins; TM - Transmembran Untereinheit des Envelope-Proteins)

1.1.2 DAS RETROVIRALE GENOM

Das Genom von Retroviren wird von zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen gebildet. Die Größe jedes RNA-Moleküls liegt je nach Virustyp zwischen 7 und 10 kb. Die RNA-Moleküle besitzen jene Modifikationen, über die auch zelluläre mRNA's verfügen. Das betrifft zum einen die Cap-Struktur am 5' Ende und zum anderen die Polyadenylierung am 3' Ende der Moleküle. Für diese Modifikationen werden die gleichen zellulären Enzyme genutzt, die ebenfalls für die Prozessierung von zellulären mRNA's verantwortlich sind [3].

Die Anordnung der viralen Gene und cis-wirkenden Bereiche folgt bei den C-Typ Retroviren, dem auch das in dieser Arbeit untersuchte amphotrope 4070A MLV (murine leukemia virus) angehört, in etwa dem gleichen Muster (siehe Abbildung 1.2).

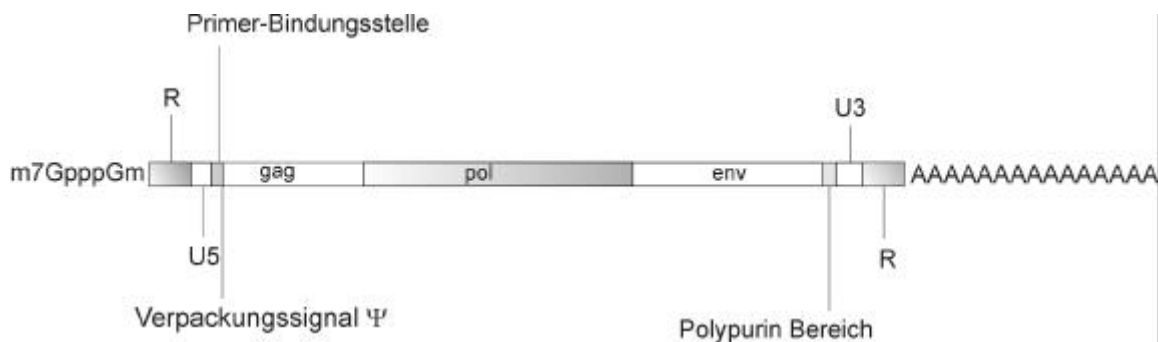


Abb. 1.2: Schema zum Aufbau und zur Struktur des retroviralen Genoms, (R - Repeat; U3 - nichttranslatierte Region im 3' Bereich; U5 - nichttranslatierte Region im 5' Bereich des viralen Genoms; gag, pol, env – retrovirale Gene, siehe Abschnitt 1.1.2)

Das im 5' Bereich des Genoms lokalisierte gag-Gen kodiert für das Matrix-, Kapsid- und Nukleoprotein. Die viralen Enzyme, wie die Protease, die Integrase und die reverse Transkriptase, werden vom pol-Gen kodiert. Das env-Gen beinhaltet die Sequenzen für die Bildung des oben erwähnten Envelope-Proteins.

Am 5' und 3' Ende des viralen Genoms existieren einige cis-wirkende Sequenzbereiche, die wichtige Funktionen bei der Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom, der reversen Transkription, der Replikation und der Verpackung des Virusgenoms in virale Partikel haben. Alle retroviralen Genome haben identische Enden (R). Die Redundanz dieser Bereiche ist für die Replikation der Viren von entscheidender Bedeutung.

1.1.3 DER REPLIKATIONSZYKLUS

Der Replikationszyklus der Retroviren ist ein zweiphasiger Prozeß, bestehend aus Infektion der Wirtszelle und der Vermehrung der Viren. Zum ersten Abschnitt wird die Bindung an den viralen Rezeptor, die reverse Transkription des viralen Genoms und die Integration des entstandenen Provirus in das Genom des Wirtes gerechnet. Der zweite Abschnitt besteht im wesentlichen aus der Synthese der genomischen Virus-RNA und der viralen Proteine sowie dem

Zusammenbau und der Freisetzung der viralen Partikel [3]. Der Prozeß ist schematisch in Abbildung 1.3 dargestellt.

Der Replikationszyklus der Retroviren beginnt möglicherweise mit einer anfänglich unspezifischen Anheftung des Virus an die Wirtszelle [7], deren Mechanismus noch weitgehend ungeklärt ist. Die Bindung an den für die jeweilige Virusart spezifischen Rezeptor erfolgt dann wahrscheinlich durch freie Diffusion auf der Wirtszelloberfläche. Das Modellvirus für die Untersuchungen im Rahmen dieser Promotionsarbeit war das 4070A MLV, das als amphotroper Retrovirus murine und nichtmurine Zelltypen infizieren kann. Der Rezeptor für die Infektion mit 4070A MLV ist Pit2, ein Natrium-abhängiger Phosphat-Symporter, der von dem *ram-1* Gen kodiert wird [8, 9]. Die Anzahl der Rezeptoren für den amphotropen 4070A Retrovirus pro Zelle schwankt je nach Zellart zwischen 7×10^4 und 2×10^5 . Aber nur ein geringer Anteil kann als Virusrezeptor funktionieren und nimmt an der Internalisierung der Viren teil [10].

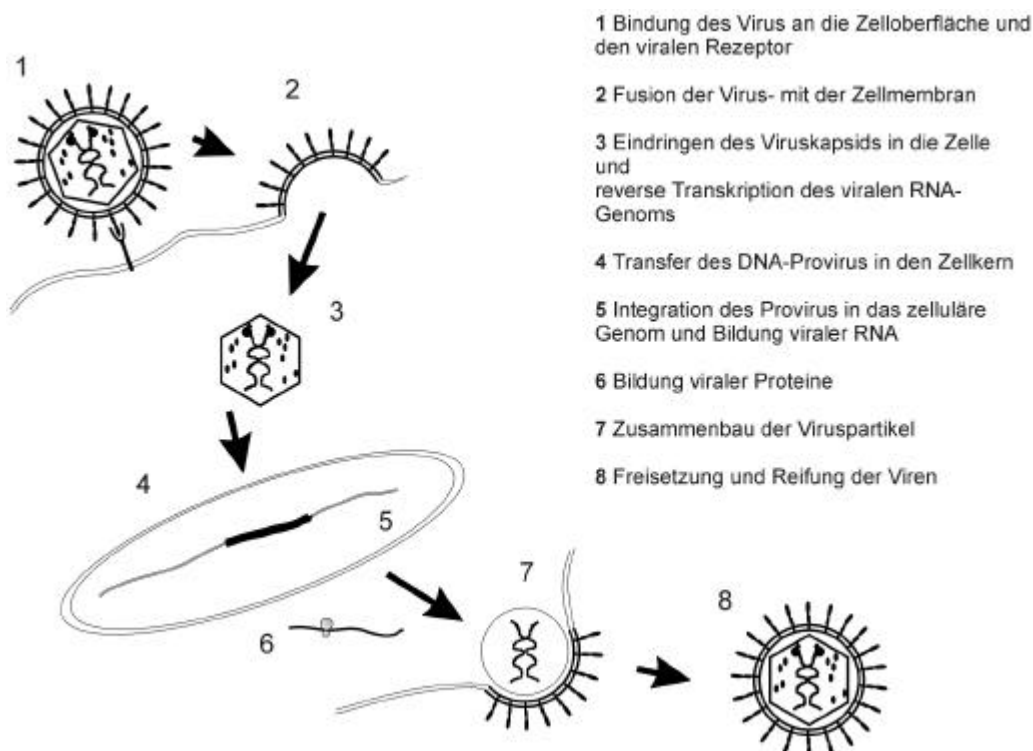


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von C-Typ Retroviren, nach Coffin et al. [3]

Wie das Virus in die Zelle gelangt, ist zur Zeit noch nicht endgültig geklärt. Bisher wurde davon ausgegangen, daß die Infektion mit amphotropen Viren pH-unabhängig, vermutlich über die direkte Fusion des Virus mit der Zellmembran der Wirtszelle erfolgt [11]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Katen et al. wird dieser bisher gültigen Theorie allerdings widersprochen und für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle der endocytotische Weg vorgeschlagen [12].

Nach der Fusion des Virus mit der Zellmembran wird das virale Kapsid in das Cytoplasma entlassen. Mit dem Eintritt in das Cytoplasma der Wirtszelle beginnt die Umschreibung des viralen Genoms in doppelsträngige DNA. Dabei ist die Eigenschaft der beteiligten Enzyme, einen DNA-Strang an die Position einer anderswo im Genom vorhandenen identischen DNA-Sequenz zu transferieren, von entscheidender Bedeutung (siehe Abbildung 1.4).

Im Anschluß an die Umschreibung des viralen RNA-Genoms in die DNA wird der sogenannte Nukleoproteinkomplex, bestehend aus der linearen proviralen DNA, Kapsidproteinen, Integrase sowie eventuell Nukleoproteinen und reverser Transkriptase, in den Kern der Zelle transferiert [14]. Dieser Prozeß ist bei MLV abhängig von der Auflösung der Kernmembran während der Mitose der Wirtszelle, so daß eine Infektion nur bei sich teilenden Zellen erfolgen kann [15]. Nachdem der Nukleoproteinkomplex in den Zellkern gelangt ist, wird die provirale DNA durch die Aktivität der viralen Integrase in das Genom der Zelle integriert. Für diesen Prozeß werden wahrscheinlich Bereiche im Genom bevorzugt, die transkriptionell aktiv sind [16, 17]. In neueren Untersuchungen wird dieser bisherigen Meinung allerdings widersprochen. Diesen Berichten zufolge scheinen transkriptionell aktive Bereiche nicht für die Integration bevorzugt zu sein, sondern verringern möglicherweise die Wahrscheinlichkeit einer Integration sogar [18].

Mit der Integration der proviralen DNA ist der erste Teil des Replikationszyklus abgeschlossen. Der zweite Abschnitt beginnt mit der Synthese der viralen Proteine und der Bildung viraler RNA-Genome. Promotor und Enhancer für die Bildung der RNA durch die zelleigene RNA Polymerase II liegen in den LTR's, ebenso wie die Polyadenylierungsstelle für die Termination der Transkription [19]. Es werden zwei Formen von mRNA gebildet. Die eine dient sowohl als virales Genom als auch als Transkript für die Bildung der gag und pol kodierten

Proteine. Sie umfaßt das vollständig vom Provirus umgeschriebene RNA-Molekül. Ein Teil dieser RNA-Moleküle dient als gespleißte Variante der Bildung der Envelope-Proteine [3].

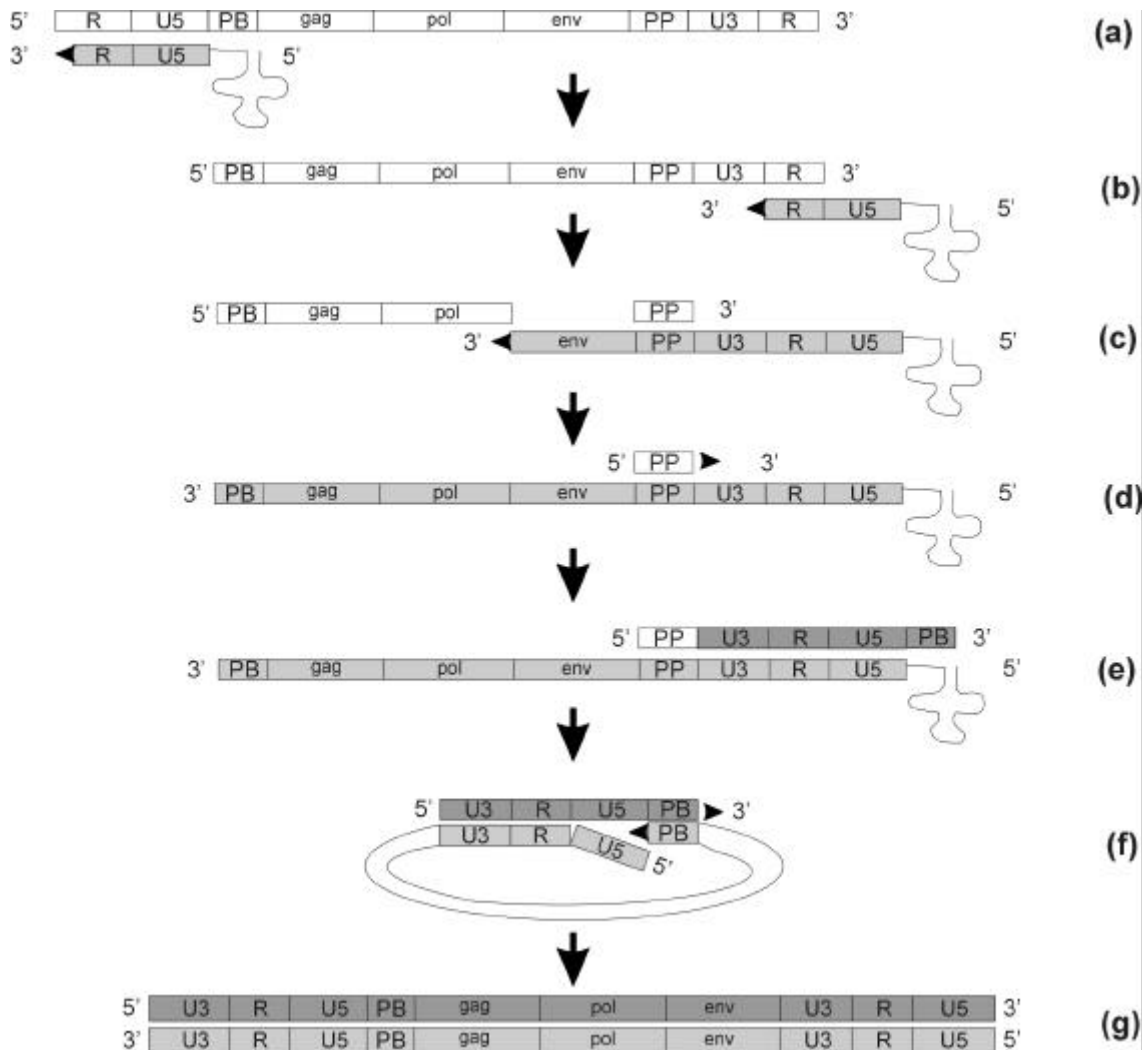


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Synthese des DNA-Provirus bei Retroviren, (R - Repeat; PB- Primerbindungsstelle; PP - Polypurin-Region; U3 - nichttranslatierte Region im 3' Bereich; U5 - nichttranslatierte Region im 5' Bereich des viralen Genoms; gag, pol, env – retrovirale Gene, siehe Abschnitt 1.2.2; weiße Boxen – RNA; hellgraue Boxen – DNA-Provirus-Minusstrang; dunkelgraue Boxen – DNA-Provirus-Plusstrang) Die Initiierung der DNA-Synthese beginnt mit der Anlagerung eines tRNA-Moleküls an die PB-Region (Primer-Bindungsstelle) des viralen Genoms. Die tRNA dient als Primer für die Bildung des Minusstrangs der proviralen DNA. Dazu erfolgt als erstes die Synthese der sogenannten strong-stop cDNA durch die virale reverse Transkriptase (a) [13]. Anschließend wird der neu synthetisierte Strang an das 3'-Ende der genomischen RNA transferiert (b), um die Synthese der DNA fortzusetzen (c). Durch die RNaseH-Aktivität der reversen Transkriptase wird die RNA im RNA-DNA-Hybridmolekül abgebaut (d) und die Synthese des Plusstrangs ermöglicht. Als Primer wird dazu die RNA der PP-Region verwendet, die resistent gegenüber der RNaseH-Aktivität der reversen Transkriptase ist. Die Elongation erfolgt bis zum 5'-Ende des Minusstrangs (e). Anschließend findet ein weiterer Transfer des DNA-Stranges statt, wobei die Verdoppelung der Primer-Bindungsstelle durch den Transfer der strong-stop cDNA bei der Minusstrangsynthese ausgenutzt wird (f). Die Komplementierung des Plusstrangs kann nun fortgesetzt werden (g). nach Coffin et al. [3]

Der Prozeß des Zusammenbaus und der Freisetzung der retroviralen Partikel erfolgt bei C-Typ Retroviren, zu denen auch der 4070A MLV gehört, simultan. Beides geschieht direkt an der Plasmamembran der Wirtszelle, wobei der Zusammenbau der bis heute am wenigsten verstandene Teil des Lebenszyklus der Retroviren ist. Für die Zusammensetzung des Virus bindet das gag-Vorläuferprotein das virale RNA-Genom, die Kapsidproteine der gebildeten gag-Vorläuferproteine assoziieren miteinander und das N-terminale Matrix-Protein bindet an die zelluläre Plasmamembran. Nach Fertigstellung und Freisetzung des viralen Partikels beginnt der Reifungsprozeß: aus den Vorläuferproteinen werden die einzelnen Proteine durch die Aktivität der viralen Protease gebildet und es werden durch die Abspaltung des R-Peptids von der Transmembranuntereinheit die fusiogenen Eigenschaften des Envelope-Proteins hergestellt [3].

Diese Grundsätze für den Infektions- und Replikationsprozeß von C-Typ Retroviren gelten auch für die aus diesen Viren abgeleiteten retroviralen Vektoren. Für die Generierung der retroviralen Vektoren wurden alle viralen Gene deletiert und durch mindestens ein therapeutisches Gen ersetzt. Der Vektor wird von den viralen LTR's flankiert, die für die Expression des therapeutischen Gens und die Verpackung in die Viren essentiell sind. Für die Bildung und Freisetzung der rekombinanten Retroviren werden die retroviralen Vektoren in sogenannte Verpackungszelllinien transfiziert. Diese Verpackungszelllinien exprimieren alle retroviralen Gene *in trans* und sind so in der Lage, die RNA, die vom retroviralen Vektor abstammt, in virale Partikel einzubauen.

1.2 PRODUKTION UND STABILITÄT RETROVIRALER VEKTOREN

Die Produktion rekombinanter Retroviren erfolgt hauptsächlich mit murinen und humanen Verpackungszelllinien. Die Verwendung muriner Zelllinien weist jedoch einige Nachteile auf. So kann es aufgrund endogener retroviraler Sequenzen zur Bildung replikationskompetenter Viren kommen [20]. Des weiteren sind die gebildeten Viren aufgrund einer beim Menschen nicht auftretenden Glykosylierungsstruktur ein Ziel für das menschliche Immunsystem, was eine schnelle Inaktivierung der Viren im humanen Serum nach sich zieht [21]. Aus diesen Gründen werden häufig Verpackungszelllinien humanen Ursprungs eingesetzt, die diese Nachteile muriner Zellen nicht aufweisen [22, 23].

Die Produktion von Retroviren für den Einsatz in der Gentherapie unterscheidet sich erheblich von der im Labormaßstab. Sowohl die Menge und Konzentration an infektiösen viralen Partikeln als auch ihre Reinheit verlangen zum Teil einen deutlich höheren Aufwand an Material und Prozeßtechnik. So werden für eine *in vivo* Therapie pro Patient zwischen 100 bis 1000 ml Virussuspension benötigt. Es wird davon ausgegangen, daß bis zu 10^{14} infektiöse virale Partikel für eine einzelne Dosis bei einer erfolgreichen Therapie zur Verfügung stehen müssen [2, 24, 25].

Dem hohen Bedarf an Retroviren steht jedoch eine relativ geringe Bildungsrate durch die Produktionszelllinien gegenüber. Sie liegt durchschnittlich bei circa 1×10^5 infektiösen Viren, die pro Stunde von 10 Millionen Zellen gebildet werden [26]. Diese Produktivität macht den Einsatz von Bioreaktoren erforderlich, die die notwendigen Volumina und Zelldichten der Produktionszellen gewährleisten können. Weiterhin müssen die eingesetzten Reaktoren und Aufarbeitungsprozesse den physikochemischen Eigenschaften der Retroviren angepaßt sein. So dürfen aufgrund der viralen Instabilität keine großen Scherkräfte und Verweilzeiten in den Bioreaktoren auftreten. Zum Einsatz kommen unterschiedliche Systeme, wobei solche bevorzugt werden, in denen die Zellen auf Microcarriern immobilisiert werden [2]. Dies hat den Vorteil, daß die Viren relativ einfach von den Zellen abgetrennt werden können und der Reaktor im sogenannten Perfusionsmodus betrieben werden kann. Dadurch verringert sich die Verweildauer der retroviralen Partikel im Bioreaktor, was von entscheidender Bedeutung ist, da die Hälfte der produzierten Retroviren schon nach 3,5 bis 9 Stunden bei einer Produktionstemperatur von 37°C inaktiviert worden ist [26-31]. Infolgedessen erhöht sich auch die Virusrückgewinnung und der Anteil an infektiösen Viren an der Gesamtpartikelzahl [2, 32].

Neben der Anpassung der Produktionssysteme an die viralen Eigenschaften zur Erhöhung der Anzahl an infektiösen Viren wurde versucht, durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen die Produktionsrate zu erhöhen. Mehrere Autoren zeigten, daß eine 2 bis 20fach höhere Virusakkumulation durch die Absenkung der Produktionstemperatur von 37°C auf 32°C erreicht wird. Hierbei kommt bei ähnlicher Produktionsrate die größere Stabilität der viralen Partikel bei 32°C zum Tragen [26, 27, 33, 108]. Durch die Absenkung der Temperatur auf 32°C wird die Vitalität der Zellen nur minimal beeinträchtigt, aber die Stabilität der Retroviren ist bei dieser Temperatur um das dreifache und mehr erhöht, was zu der erwähnten Akkumulation der Viren und der Erhöhung der Endpunkttiter führt. Diese Methode ist jedoch nicht unumstritten. So konnten Forestell et al. durch die Produktion bei 32°C keine Änderung

der viralen Titer erreichen und Cruz et al. empfehlen für die Bildung der Retroviren 37°C als Produktionstemperatur [32, 139].

Eine weitere Möglichkeit, die Anzahl infektiöser Partikel zu steigern, ist der Zusatz von Additiven, die den RNA Gehalt der viralen Partikel und die Promotoraktivität steigern. Dazu werden Natriumbutyrate, Dexamethason oder TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) verwendet [34, 35].

Eine optimale Produktion sollte in der Bildung von kleinen Volumina eines retroviralen Stocks resultieren, der eine hohe Konzentration an aktiven Retroviren aufweist.

Die Produktion von 1000 Litern und mehr an retrovirushaltigen Zellkulturüberständen mit einer meist nicht ausreichend hohen Konzentration und Reinheit der viralen Partikel macht eine Aufarbeitung und Aufkonzentrierung der Viren notwendig. Dabei ist die Wahl der zu verwendenden Methoden zwar wiederum stark von den Eigenschaften der Viren abhängig, aber es muß auch gewährleistet werden, daß Verunreinigungen und Inhibitoren der viralen Transduktion, wie z.B. Proteoglykane [36, 37], eliminiert werden. So wird die im Labor häufig verwendete Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation kaum noch angewendet, da der Verlust an infektiösen Retroviren durch die auftretenden Scherkräfte zu groß ist. Zum Einsatz kommen deshalb vor allem Membranfiltration und Größenausschlußchromatographie [27, 28, 38, 39]. Die Vorteile dieser Methoden liegen in einer hohen Aufkonzentrierung bei einer gleichzeitig großen Vitalität der Retroviren (bis zu 90%). Proteoglykane können mit diesen Techniken nicht von den Viren abgetrennt werden, allerdings wurde bis zum heutigen Zeitpunkt keine Methode entwickelt, die einen Ausschluß dieser Inhibitoren erlaubt, ohne einen erheblichen Verlust an vitalen retroviralen Partikeln zu verursachen.

Für die Anfälligkeit der Retroviren gegenüber physikochemischem Streß, z.B. bei der Zentrifugation oder chromatographischer Aufreinigungsmethoden, wird allgemein die Bindung der beiden Untereinheiten des Envelope-Proteins als Hauptgrund angesehen. Die Art der Bindung war und ihre Stabilität ist umstritten. So wurde zwar früh eine Disulfidbrückenbindung zwischen den Untereinheiten nachgewiesen [40]. Aber die Möglichkeit, daß die beiden Untereinheiten auch über nichtkovalente Interaktionen verbunden sein könnten, wurde durch Studien gestützt, in denen freies Envelope-Protein im Überstand von infizierten Zellen und die Zerstörung der Bindung zwischen den beiden Untereinheiten durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Viren nachgewiesen wurde [41-43]. Auch durch mechanische Beanspruchung

der viralen Partikel löst sich vermutlich die SU-Untereinheit vom Transmembran-Protein und führt zur Abnahme der viralen Infektiosität. Mittlerweile ist die Bindung der Untereinheiten über Disulfidbrücken aber akzeptiert. Wie groß die Stabilität dieser Bindungen ist und ob diese den Grund für die Sensibilität der Viren gegenüber physikochemischem und mechanischem Streß darstellt, ist jedoch weiterhin umstritten [44, 45].

Von einigen Arbeitsgruppen wird empfohlen, die Produktion von Retroviren aufgrund der erhöhten Virusakkumulation bei 32°C durchzuführen [26, 33]. Es ist jedoch fraglich, ob die dort beobachteten erhöhten Titer als Grund für eine Produktion bei 32°C ausreichend sind. Zum einen ist dieser Effekt, wie erwähnt, umstritten und zum anderen sind bisher keine Untersuchungen durchgeführt worden, die klären, welche Effekte die Absenkung der Produktionstemperatur auf die Zelle und somit auf die eng assoziierten viralen Eigenschaften hat. Diese Analysen sind jedoch unerlässlich, da bekannt ist, daß Zellen mit einer veränderten Membranzusammensetzung auf die Reduzierung der Umgebungstemperatur reagieren [140]. Dies schließt Änderungen in dem Verhältnis der Lipidarten und des Lipid-Protein-Verhältnisses ein. Diese Modifikationen wiederum führen zu Änderungen der Plasmamembraneigenschaften.

Bei der Freisetzung der retroviralen Partikel bildet das Virus seine Membran aus Teilen der zellulären Plasmamembran. Die Zusammensetzung der viralen Membran entspricht im wesentlichen der zellulären Membran. Es kommt nur zu einem minimalen Ausschluß von Plasmamembranproteinen durch das Virus [46]. Das bedeutet, wenn es durch die geringere Umgebungstemperatur zu einer Änderung der Membraneigenschaften der Produktionszelle kommt, diese auch auf das Virus übertragen werden können. Das betrifft zum Beispiel die Fluidität der Membran, vermittelt durch den Cholesteringehalt der Plasmamembran, die einen Einfluß auf die mechanische Stabilität des Virus haben könnte.

In welchem Maße die reduzierte Produktionstemperatur von 32°C Einfluß auf zelluläre und virale Eigenschaften nimmt und wie das Cholesterin der zellulären Membran die Stabilität von Retroviren beeinflusst, wird im Rahmen dieser Arbeit erörtert werden.

Aber auch bei dem Zusammenbau und der Freisetzung der Retroviren hat Cholesterin einen indirekten Einfluß auf den Lebenszyklus der Viren. Für den Zusammenbau und die Freisetzung der viralen Partikel scheinen die Bereiche der Membran, die eine erhöhte Envelope-

Proteinkonzentration aufweisen, bevorzugt zu werden. Zu einer Anreicherung der Envelope-Proteine scheint es vor allem in cholesterinreichen Regionen der Zellmembran, in den sogenannten Rafts und den Caveolae, zu kommen. Die Bedeutung der Rafts und Caveolae für die Bildung und Freisetzung der Retroviren aber auch für den Infektionsprozeß wurde erst in den letzten Jahren erkannt (s. Abschnitte 1.3.2 und 1.3.7).

Aufgrund der Bedeutung des Cholesterins für die Stabilität von Membranen und den Lebenszyklus von Retroviren soll in den nächsten Abschnitten näher auf die Cholesterinbiosynthese und seine Organisation innerhalb cholesterinreicher Mikrodomänen in der Zelle eingegangen werden.

1.3 CHOLESTERIN

1.3.1 BEDEUTUNG DES CHOLESTERINS FÜR EUKARYOTISCHE ZELLEN

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran von Zellen. Es wird von eukaryotischen Zellen synthetisiert oder über Lipoproteine aufgenommen. Der Gehalt an Cholesterin innerhalb der Plasmamembran wurde anfangs lediglich für die Fluidität der Membran und damit für die Beweglichkeit und Flexibilität der zellulären Membranen verantwortlich gemacht. So führt eine Erhöhung des Cholesteringehaltes in der Plasmamembran zur Reduzierung der Membranpermeabilität und verstärkt gleichzeitig die mechanische Stabilität des Lipid-Bilayers [47]. So ist es möglich, daß der Cholesteringehalt der Plasmamembran der Wirtszelle einen Einfluß auf die mechanische Stabilität produzierter Retroviren hat. Dieser Zusammenhang wurde zwar postuliert, konnte bisher aber nicht nachgewiesen werden.

Cholesterin ist aber nicht nur für die Beweglichkeit von Membranen wichtig. In jüngster Zeit wurde deutlich, daß für eine Vielzahl zellulärer Funktionen die Konzentration an Cholesterin in der Membran von entscheidender Bedeutung ist. So werden anscheinend ganze Signaltransduktionswege direkt oder indirekt durch Cholesterin beeinflußt und reguliert [48]. Einfluß auf solche für die Zellen grundlegenden Vorgänge übt das Cholesterin unter anderem über die Rafts und Caveolae aus.

1.3.2 CAVEOLAE UND RAFTS

Cholesterin ist nicht gleichmäßig in der Plasmamembran verteilt, sondern kommt vielmehr gehäuft in Mikrodomänen vor [49]. Die Struktur dieser Mikrodomänen ist ganz entscheidend davon abhängig, ob in dem jeweiligen Zelltyp Caveoline exprimiert werden [50]. Zur Zeit sind drei unterschiedliche Caveolin-Gene bekannt, Caveolin 1 bis 3 [51]. Caveolin 3 wird muskelspezifisch exprimiert, währenddessen die Caveoline 1 und 2 in Adipocyten, Endothelzellen und Fibroblasten vorkommen. Die Caveolin-Proteine bilden Homo- und Heterooligomere. Dabei binden die Caveoline Cholesterin und diese Polymerisierung wiederum führt zur Entstehung der sogenannten Caveolae, die Einstülpungen in der zellulären Plasmamembran bilden (s. Abb. 1.5) [52]. Die Struktur der Caveolae ist dabei stark vom Cholesterin abhängig. Die Entfernung von Cholesterin aus der Membran führt zur Auflösung und zum Verlust der Caveolae [47].

In Zellen, die kein Caveolin exprimieren, wird die Funktion der Caveolae von sogenannten Rafts übernommen. Rafts sind cholesterinreiche Regionen der Zellmembran, die im Gegensatz zu den Caveolae keine Einstülpungen in die Membran ausbilden, sondern vermutlich floßartig in cholesterinärmeren Regionen der Plasmamembran „schwimmen“ [53]. Inwieweit Caveolae und Rafts in Caveolin exprimierenden Zellarten nebeneinander existieren oder ob die Rafts eine Vorstufe bei der Bildung von Caveolae darstellen, wird gegenwärtig noch diskutiert [51, 48, 54]. Bei der Bildung und der Funktion der Rafts hat das Cholesterin wie bei den Caveolae eine Schlüsselrolle inne. Der Zusammenbau ist ein dynamischer Prozeß, der seinerseits wiederum wesentlich an der Sortierung, Konzentrierung und der Verteilung von Lipiden und Proteinen an der Zelloberfläche beteiligt ist [49]. Innerhalb der Rafts interagiert Cholesterin mit anderen Membranlipiden und -proteinen, wo es auch eine Rolle bei der Generierung der Zelloberflächen-Polarität spielt [53, 55, 56]. Eine der wichtigsten Funktionen der Rafts und Caveolae ist ihr Anteil an der Signaltransduktion. In diesen cholesterinreichen Mikrodomänen werden Rezeptoren aufkonzentriert und nach Bindung von Liganden durch die Aktivität lokal vorhandener Kinasen und Phosphatasen modifiziert und dadurch die Signalwege aktiviert [48]. Daneben konnte für verschiedene virale Systeme die Beteiligung der Rafts und Caveolae an essentiellen viralen Prozessen wie dem Zusammenbau der Viren, der Virusfreisetzung und der Infektion der Wirtszelle gezeigt werden, worauf in Abschnitt 1.3.4 noch näher eingegangen wird [38-45].

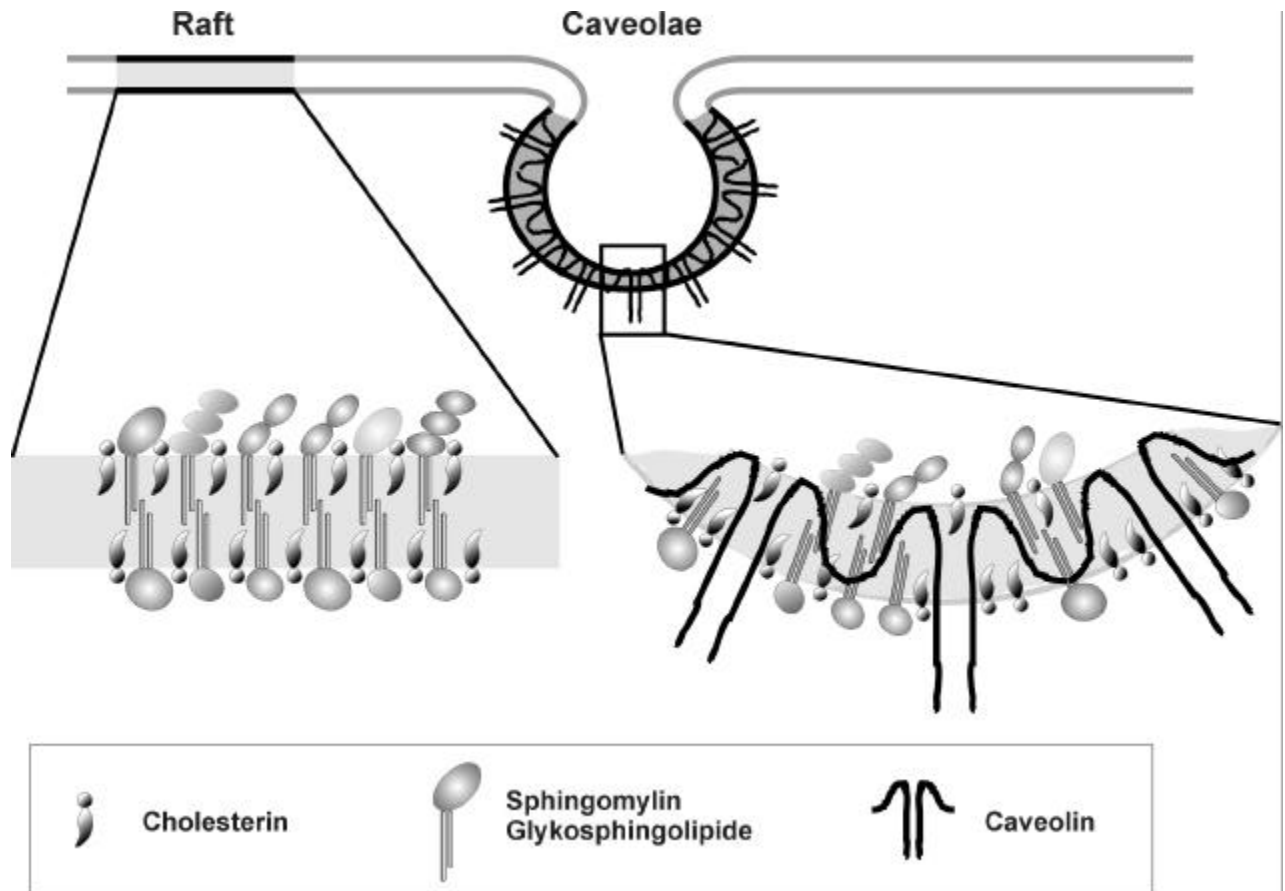


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Rafts und Caveolae in der zellulären Plasmamembran, nach Simons et al. [53]

Die Lipidzusammensetzungen der Rafts ähnelt denen der Caveolae. Diese werden aus Cholesterin und Sphingolipiden, bestehend aus Sphingomyelin und Glykosphingolipiden, gebildet. Cholesterin verdichtet die Packung der Sphingolipidmoleküle durch Bindung über Wasserstoffbrückenbindungen und verringert so die Beweglichkeit der Membran. Es wird vermutet, daß der exoplasmatische Teil der Rafts an den darunterliegenden cytoplasmatischen Teil gekoppelt ist [57] und so die sogenannte geordnete Flüssigphase (liquid-ordered phase) bildet. Die Rafts wiederum sind in der ungeordneten Flüssigphase verteilt, wo der exo- und cytoplasmatische Teil des Lipid-Bilayers nicht miteinander verbunden sind [49]. Bei der Einlagerung von Cholesterin in die Plasmamembran scheint die geordnete Flüssigphase bevorzugt zu sein.

Caveolae, Rafts und das in ihnen angereicherte Cholesterin sind für die Funktion einer Vielzahl von membrangebundenen Proteinen wichtig. Dazu gehören Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankerte Proteine, doppelt acetylierte periphere Membranproteine, Proteine, an die eine Palmitinsäure gekoppelt ist, an Cholesterin gebundene Proteine und Transmembran-Proteine [53]. Diese Proteine sind mit den Rafts und Caveolae assoziiert und in ihnen im Vergleich zur übrigen Plasmamembran aufkonzentriert. In der Regel sind pro Raft 10 bis 30 Proteine eingelagert. Ein Raft selbst mißt circa 50 nm im Durchmesser, das entspricht ungefähr 3500 Sphingomyelin-Molekülen [47]. Die Größe hängt aber auch vom Cholesterin- und Sphingolipidgehalt der Zelle ab. Weiterhin wird eine Zusammenlagerung von Rafts durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen einzelnen Rafts diskutiert.

1.3.3 CHOLESTERINSTOFFWECHSEL

Die Synthese des Cholesterins findet hauptsächlich im ER der Zelle statt. Die Bildung von Cholesterin beginnt mit Acetyl-CoA-Molekülen und läßt sich in fünf Abschnitte unterteilen, deren wichtigste Zwischenstufen in Abbildung 1.6 erläutert sind.

Im Anschluß an die Synthese wird das Cholesterin zur Plasmamembran transportiert und dort eingebaut (siehe Abbildung 1.7). Der Transport kann dabei über den Golgi oder bei Blockierung dieses Transportweges ohne Beteiligung des Golgi direkt zur Membran erfolgen. Welche Mechanismen an dem Golgi-unabhängigen Transport beteiligt sind, ist zur Zeit noch nicht vollständig geklärt [58]. Es könnte sich zum einen um einen unbekannten Transportmechanismus vom ER zur Zelloberfläche oder zum anderen um einen Carrierprotein vermittelten Transportweg handeln [59]. Denkbar ist allerdings auch ein Membran-Membran-Kontakt von Plasmamembran und ER, wie er für den Transport von Phospholipiden zwischen ER und Mitochondrien diskutiert wird [60]. Neben der Synthese von Cholesterin nehmen die meisten Zellen auch an Lipoproteine gebundenes exogenes Cholesterin auf. Dies kann a) durch den Transfer von Cholesterin vom Lipoprotein zur cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran oder b) durch Rezeptor vermittelte Endocytose geschehen [61].

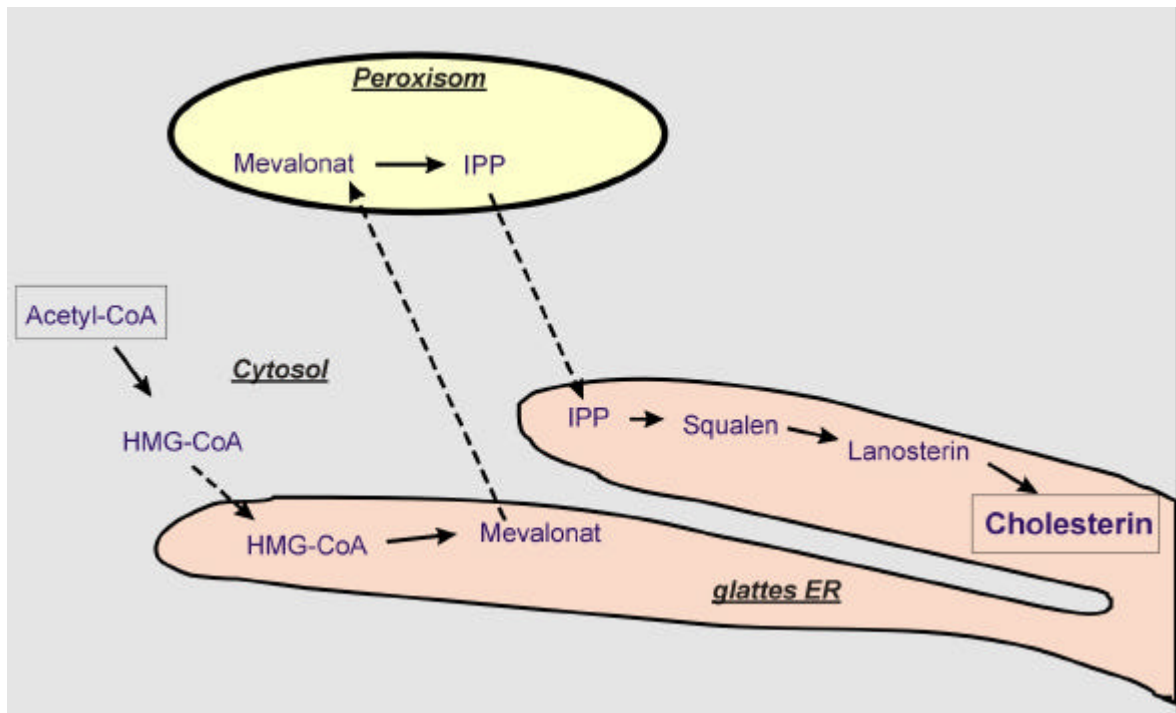


Abb. 1.6: Schematische Übersicht über die Biosynthese von Cholesterin

Im ersten Abschnitt entsteht HMG-CoA (Hydroxymethylglutaryl-CoA) durch die Kondensation von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA, welches selbst aus 2 Acetyl-CoA-Molekülen gebildet wird. Das HMG-CoA wird im nachfolgenden Schritt durch die HMG-CoA-Reduktase in Mevalonat umgewandelt. Diese Reaktion ist die Schlüsselreaktion für die Biosynthese von Cholesterin und unterliegt einer strengen Regulation. In den nachfolgenden Reaktionen entsteht Isopentenylpyrophosphat (IPP), welches im nächsten Abschnitt der Biosynthese als Ausgangsmolekül zur Bildung von Squalen dient, aus welchem wiederum Lanosterin gebildet wird. Diese und die nachfolgenden Reaktionen, die eigentliche Synthese von Cholesterin, finden im glatten ER der Zelle statt. Dabei wird Lanosterin in einer Folge von 19 Reaktionen (Methylgruppen werden angelagert, Doppelbindungen wandern oder werden reduziert, Cyclisierung erfolgt) zu Cholesterin umgewandelt. (CoA – Coenzym A; HMG-CoA – Hydroxymethylglutaryl-CoA; IPP – Isopentenylpyrophosphat)

Zusätzlich zu dieser sogenannten schnellen Route gibt es weitere Mechanismen und Wege zur Freisetzung des LDL-gebundenen Cholesterins, an denen die späten Endosomen und die Lysosomen beteiligt sind. An der Ausschleusung des LDL-Cholesterins aus den späten Endosomen oder Lysosomen ist das NPC1 Protein beteiligt, das in den späten endocytotischen Strukturen lokalisiert ist [62]. NPC1 besitzt mehrere membrandurchspannende Regionen und eine Sterol detektierende Domäne [63]. Eine potentielle Funktion für die Sterol detektierende Domäne ist die Bindung von Cholesterin. Es wird vermutet, daß das Protein seine Lokalisierung mit erhöhtem Cholesteringehalt der späten Endosomen oder Lysosomen ändert und im Golgi akkumuliert [62, 64, 65].

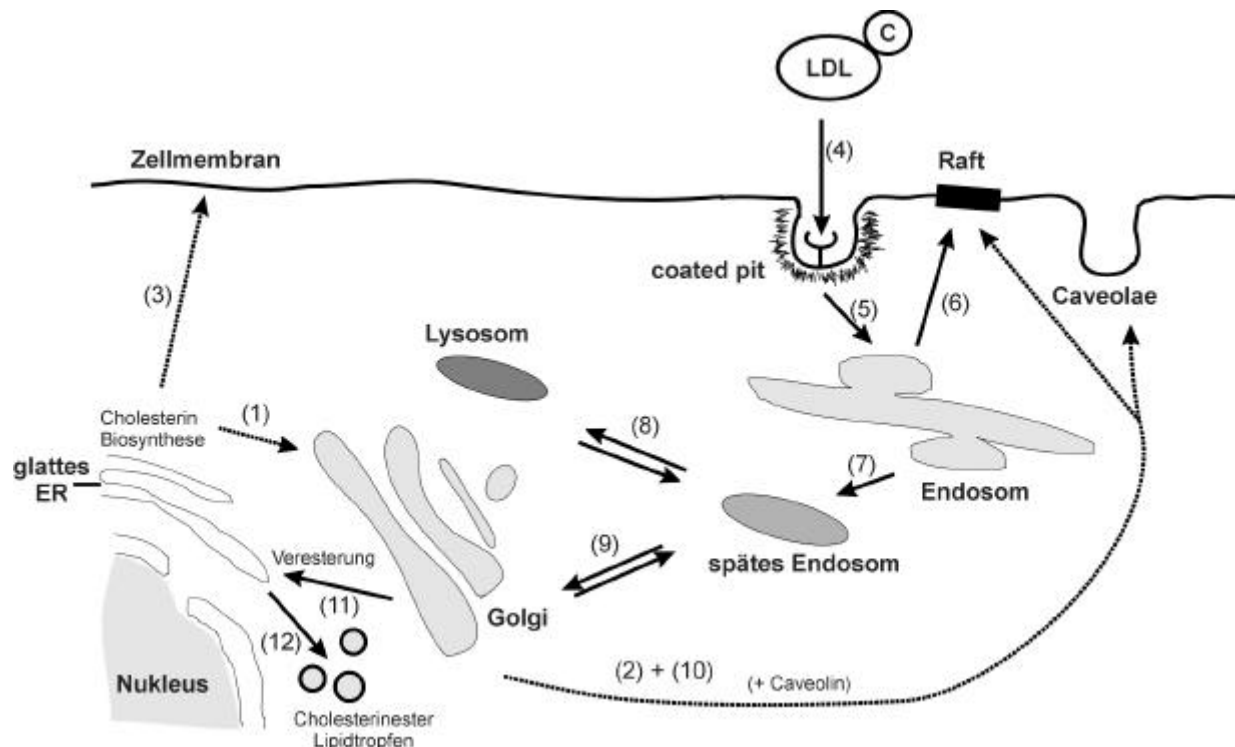


Abb. 1.7: Cholesterinwege in der Zelle, (LDL – low density lipoprotein; ER – endoplasmatisches Retikulum; C - Cholesterin)

Transport von endogenem Cholesterin zur Plasmamembran: Das von den Zellen gebildete Cholesterin wird im ER anfangs bevorzugt in nicht-Raft Membranregionen eingelagert, wird zum Golgi transportiert und dort in Rafts eingebaut (1) [58]. Vom Golgi gelangen diese an die Zelloberfläche, wo es zu einer Anreicherung von Sphingolipiden und Cholesterin kommt (2) [66-68]. Neben diesem Weg über den Golgi-Apparat gibt es einen zweiten, der für den Transport des Cholesterins zur Plasmamembran verantwortlich ist. Wird die Ausschleusung des Cholesterins aus dem ER blockiert, umgeht der Hauptteil des synthetisierten Cholesterins den Golgi-Komplex (3).

Aufnahme von exogenem Cholesterin: Der wichtigste und am besten untersuchte Mechanismus involviert das Low-density-Lipoprotein (LDL) und den LDL-Rezeptor. In diesem Fall wird das LDL mit dem als Cholesterin-Ester gebundenen Cholesterin von seinem Rezeptor gebunden (4), mittels Endocytose via Clathrin-coated pits aufgenommen und in die Endosomen entlassen (5). Der LDL-Rezeptor wird recycled und an die Zelloberfläche zurücktransportiert, während das LDL-gebundene Cholesterin hydrolysiert wird. Das nun frei vorliegende Cholesterin wird kontinuierlich zur Plasmamembran transportiert (6).

Neben dieser schnellen Route wird das Cholesterin auch zu den späten endocytotischen Zellbestandteilen wie den späten Endosomen (7) und den Lysosomen transportiert (8). Die späten Endosomen kommunizieren mit dem exocytotischen Weg auf der Stufe des Trans-Golgi-Netzwerkes, so daß das Cholesterin zwischen den endo- und exocytotischen Routen ausgetauscht (9) und wieder zur Plasmamembran transportiert werden kann (10) [47]. Gelangt das freie Cholesterin in das ER, wird es verestert (11) und als Cholesterinester in Lipidtropfen im Cytoplasma der Zelle gespeichert (12) [47]. nach Simons et al. [47]

Das Cholesterin der LDL's wird hauptsächlich hydrolysiert, um aus den endocytotischen Organellen freigesetzt zu werden. Gelangt das freie Cholesterin jedoch wieder in das ER, wird es in Cholesterinester umgewandelt und in dieser Form gespeichert [47]. Die Veresterung von

freiem Cholesterin im ER dient der Entgiftung des überschüssigen Cholesterins. Die Cholesterinester werden in Lipidtropfen im Cytosol eingelagert.

Zelluläres Cholesterin geht kontinuierlich durch die Abgabe von Cholesterin an zirkulierende Lipoproteine verloren. Das kann bis zu 0,1% des Gesamtcholesterins ausmachen [69]. Die Abgabe kann durch Desorption aus der Plasmamembran an Lipoproteine erfolgen oder durch die Bindung von HDL's (high-density Lipoproteine) an Membranrezeptoren induziert werden [70]. In einigen Geweben, hauptsächlich der Leber und dem Darm, erfolgt die Abgabe vor allem in Form von Cholesterinestern durch Synthetisierung und Sekretierung von Lipoproteinen [71]. Ein weiterer Mechanismus ist die Freisetzung durch abgegebene Membranvesikel, die angereicherte Raft Lipide enthalten können [72].

Ein Protein, das vermutlich an der Abgabe von Cholesterin beteiligt ist, ist ABCA1 (ATP binding cassette transporter A1). Eine mögliche Funktion von ABCA1 könnte die Translokation von Cholesterin von der cyto- zur exoplasmatischen Seite des Membranbilayers sein. Da das ABCA1 Protein in der Plasmamembran und im Golgi-Komplex lokalisiert ist, ist eine Funktion beim Transport von Cholesterol vom Golgi zur Zelloberfläche ebenfalls denkbar [73, 74].

1.3.3.1 Regulation der Cholesterinbiosynthese

Die stetige Abgabe von Cholesterin und die Möglichkeit der Aufnahme von exogenem Cholesterin machen eine Regulation der Cholesterinbiosynthese durch die Zelle erforderlich. Die Kontrolle der Cholesterinbiosynthese erfolgt im ER und ist der am besten verstandene Prozeß in der Cholesterin Homöostase. Ein wesentlicher Bestandteil des Kontrollmechanismus ist der membrangebundene Transkriptionsfaktor SREBP (sterol regulatory element binding protein). SREBP wandert zwischen ER und Golgi und kann durch proteolytische Spaltungen freigesetzt werden (siehe Abbildung 1.8). Das freie SREBP kann in den Zellkern wandern und dort Gene aktivieren, die bei der Cholesterinaufnahme und -synthese der Zelle eine wichtige Rolle spielen.

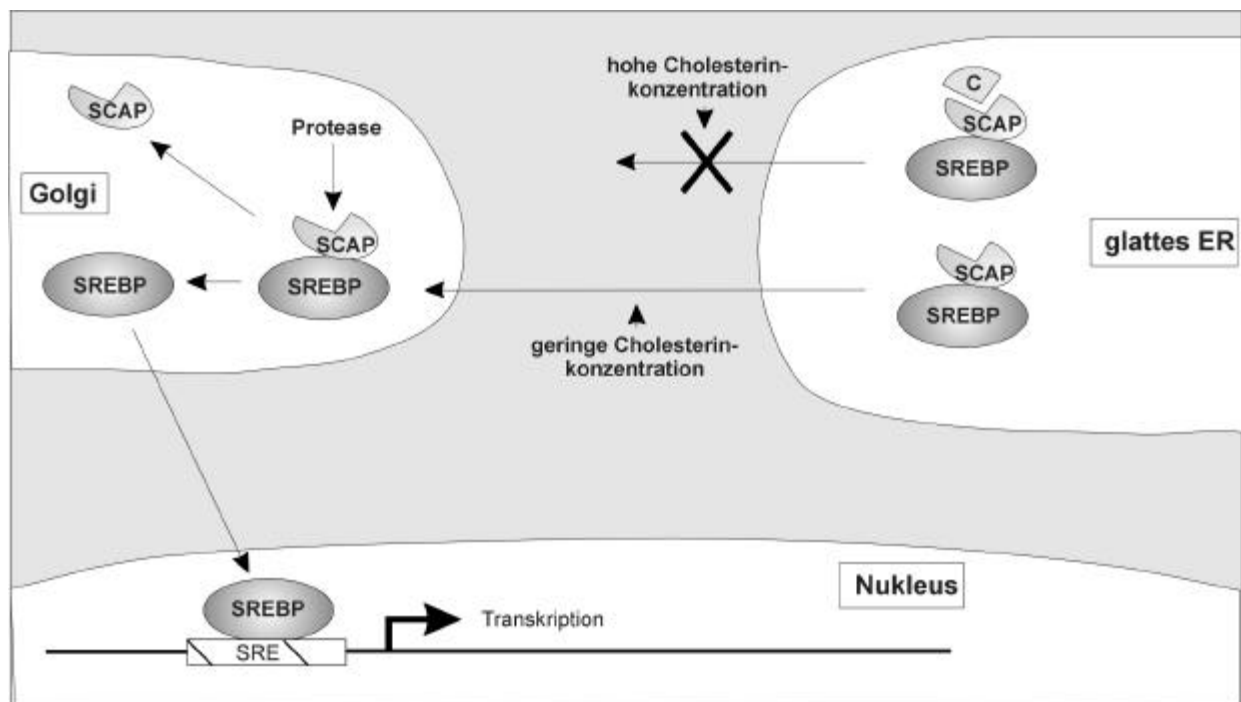


Abb. 1.8: Regulation der Cholesterinbiosynthese durch den SREBP-SCAP-Komplex. (C – Cholesterin; ER – endoplasmatisches Retikulum; SREBP – sterol regulatory element binding protein; SCAP – SREBP cleavage activating protein; SRE – sterol regulatory element)

SREBP kommt im Komplex mit SCAP vor, das eine steroldetektierende Domäne besitzt. Bei fallender Cholesterinkonzentration wird der SREBP-SCAP-Komplex zum Golgi transportiert, wo die proteolytischen Spaltungen stattfinden. Anschließend wird das so aktivierte SREBP in den Zellkern transportiert und aktiviert die Transkription von Genen für Enzyme, die an der Cholesterinsynthese beteiligt sind [47]. Bei einem erhöhten Cholesteringehalt der Zelle gelangt freies Cholesterin wieder in das ER und blockiert den Transport vom SREBP-SCAP zum Golgi. Dies führt zu einer Verlangsamung der Cholesterinsynthese und zur Speicherung von überschüssigem Cholesterin als Cholesterinester-Tropfen im Cytoplasma der Zelle.

1.3.4 EINFLUSS DES CHOLESTERINS AUF DEN VIRALEN LEBENSZYKLUS

Die Entwicklung des Raft-Modells durch K. Simons [53] und seine Bedeutung für das Verständnis der Sortierung und Konzentrierung einer Vielzahl von Membranproteinen, wie z.B. zellulären Rezeptoren, veranlaßten eine Vielzahl von Forschergruppen, ihren Einfluß auf den Zusammenbau und den Infektionsprozeß von Viren zu untersuchen. Für eine Vielzahl von Viren, wie z.B. SV40, Masernvirus, Influenzavirus und HIV, wurde der Einfluß des zellulären Cholesterins auf den viralen Lebenszyklus aufgezeigt [38-45]. Beeinflußt werden vor allem die Abschnitte im Infektionsprozeß der Viren, an denen die Plasmamembran der Wirtszelle entscheidend beteiligt ist. Dies sind der virale Eintritt sowie der Zusammenbau und die Freisetzung der Viren aus der Zelle.

So ist der CD4-Rezeptor des HIV ein raftassoziiertes Protein [52], und die Fusion des Virus mit T-Zellen wird durch Glykosphingolipide vermittelt [75]. Der Rezeptor für das ecotrope MLV, CAT1, ist mit Caveolin assoziiert, einem der Hauptbestandteile der Caveolae und die Zerstörung der Caveolae in Wirtszellen inhibiert einen frühen Schritt in der viralen Infektion [76]. Für das Influenzavirus konnte sehr detailliert die Anreicherung und Lokalisierung verschiedener viraler Proteine in den Raft Mikrodomänen nachgewiesen werden [77, 78]. 1999 zeigten Scheiffele et al., daß auch die Freisetzung dieser Viren vermutlich bevorzugt aus den cholesterinreichen Mikrodomänen erfolgt [79]. Ein Jahr später wurde dies von verschiedenen Arbeitsgruppen ebenfalls für das Masernvirus und HIV gezeigt [80, 81].

Wie Rafts und Caveolae den viralen Lebenszyklus im Detail beeinflussen, ist zur Zeit nur ansatzweise geklärt, aber es wird vermutet, daß die Rafts den Zusammenbau, die Freisetzung und den Eintritt der Viren durch die Aufkonzentrierung der an diesen Prozessen involvierten Proteine beeinflussen [76].

1.4 AUFGABENSTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals untersucht werden, welchen Einfluß die Kultivierungsbedingungen und die Zelllinie selbst auf die thermische Stabilität von 4070A MLV's haben. Die wechselseitigen Interaktionen von Produktionszelle und 4070A MLV sollten über die Erstellung von Genexpressionsprofilen eingehender untersucht und die gewonnenen Erkenntnisse für die Verbesserung der Produktion retroviraler Vektoren eingesetzt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 GERÄTE

Blotapparatur	Biorad Trans-Blot SD
Brutschränke	Forma Scientific
	Heraeus Heracell
cDNA-Array Scanner	FUJI BAS 2500
Dot Blot Apparatur	BioRad
Elektrophoreseapparaturen	Biometra Twingel G42
	Gibco BRL Horizon 58
Elektrotransformator	BioRad Gene Pulser
Fluoreszenzmeßgerät	Bio-Tek MicroTek
Geldokumentationsgeräte	Herolab Enhanced Analysis System RH-3 (E.A.S.Y.)
FACS	Becton Dickinson, FACS vantage
Inkubatoren	Eppendorf Thermomixer 5437
	Eppendorf Thermostat 5320
	Eppendorf 5417c
Kamera	Photometrics CCD-Kamera PXL 1400
	Photometrics Farb-CCD Kamera Coolsnap
Mikroskope	Nikon TMS
	Leitz Labovert FS
	Zeiss Axiovert TV135 mit Fluoreszenzvorrichtung
Magnetrührer	IKAmag Reo
Netzgeräte	BioRad Power Pac 200, 300
	Pharmacia Gene Power Supply GPS 200/400
	BioRad Power Supply Model 1000/500
PCR Real Time	Roche LightCycler
pH-Meter	Knick, pH Meter 766 Calimatic
Photometer	Hitachi U-1100

Pipetten	Eppendorf Reference 0,5 – 10 µl, Gilson Pipettman 1 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl
Pumpen	BioRad Econo Pump Neuberger N035 An18
Schüttler	Biometra WT12 Rocker
Szintillationszähler	Beckman LS 6000 IC
Sterile Werkbänke	Baker SG 400E, Klasse II Typ A/B3 Heraeus Lamin AirHLB 2472
Vortex	Heidolph REAX top
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen	Sorvall RC5C mit Sorvall GS3, GSA und SS34 Rotoren Heraeus Megafuge 1.0, 1.0R Heraeus Biofuge 15
Tischzentrifugen	Eppendorf 5417c Heraeus Biofuge fresco
Ultrazentrifuge	Beckman TL-100 Sorvall

2.1.2 VERBRAUCHSMATERIAL

Blotmembran	Milipore Immobilon-NC
Dialyseschlauch	regenerierte Cellulose, Ausschlußgrenze 12-14 kDA, Loewe 00113
Plastikmaterial	Costar, Eppendorf, Greiner, Nalgene, Nunc, Roth, Sarstedt
Sterilfilter	Sarstedt, Costar

2.2 CHEMILAKIEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Chemikalien der Firmen Amersham, Baker, Bayer, Biolabs, BioRad, Boehringer (Roche), Dako, Fluka, Gibco BRL, Invitrogen, Macherey & Nagel, Merck, Perkin Elmer, Pharmacia, Promega, Quiagen, Riedel-de-Haen, Roth, Serva, Sigma

und Strataclean verwendet. Die Enzyme und Antikörper wurden von Biolabs, Boehringer (Roche), Clontech, Gibco BRL, Molecular Probes, Perkin Elmer, ProGen und Sigma bezogen. Oligonukleotide wurden von Gibco BRL synthetisiert.

2.2.1 PUFFER UND LÖSUNGEN

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch, soweit notwendig, autoklaviert oder sterilfiltriert (0,2 µm).

TAE	1 mM EDTA; 40 mM Tris; pH 8,3
TE (10/1)	1 mM EDTA; 10 mM Tris; pH 7,5
TE (10/10)	10 mM EDTA; 10 mM Tris; pH 7,5
TKM	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 25 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA
TNB	0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,5% Blocking Reagenz (NEN); 10% Ziegsenserum
TNE	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 2 mM dTT
TNT	0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20
TBS	250 mM NaCl; 50 mM Tris; 3 mM KCl; pH 7,4
PBS	140 mM NaCl; 27 mM KCl; 7,2 mM NaHPO ₄ ; 14,7 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 6,8 – 7,0 als 10× Stocklösung von GibcoBRL, für Gebrauchslösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt
NE-Puffer	1 mM EDTA in 1×PBS
Pen/Strep	10000 µg/ml Streptomycin; 10000 U/ml Penicillin; Gibco BRL
Glutamin	200 mM; Gibco BRL
2×HEBS	280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,1

2.2.2 MEDIEN UND SEREN

LB	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl
SOC	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 2,5 mM KCl; 10 mM NaCl + 10 mM MgCl ₂ und 10 mM MgSO ₄ (vor Gebrauch zusetzen)
SOB	SOC + 20 mM Glukose
TB	2 g/l Bacto-Trypton; 24 g/l Bacto-Hefeextrakt; 4 ml/l Glycerin; + 17 mM KH ₂ PO ₄ und 72 mM K ₂ HPO ₄ (vor Gebrauch zusetzen)
DME	Gibco Dulbeccos Modified Eagle Medium 52-100 mit 10 mM HEPES und 3,75 g/l NaHCO ₃ ; als Kulturmedium ergänzt durch 10% FCS; 100 µg/ml Streptomycin; 100 U/ml Penicillin und 2 mM Glutamin
Einfriermedium	5% DMSO (Serva) in FCS
FCS	Fötales Kälberserum, Biowhittaker

2.2.3 SELEKTIONSAGENTIEN

Ampicillin	Stocklösung 50 mg/ml, Serva
G418	Stocklösung 100 mg/ml, Gibco BRL
MTX	Stocklösung 200 µg/ml

2.3 EUKARYOTISCHE ZELLINIEN

BHK-21B (C13)	Nierenzellen des Syrian Hamsters, <i>Mesocricetus auratus</i> , ATCC CCL 10, McPherson et al. [151]
BHK A	Baby Hamster Nierenzellen, abgeleitet von BHK-21B, triploider Zellkern, durch eine Reihe von Subklonierungen entstanden
HT 1080	Humane Fibrosarkomzelllinie, ATCC CCL 121, Rashed et al. [152]
NIH3T3	Maus Fibroblastenzelllinie, ATCC CCL 92
TE671	Humane Rhabdomyosarcomazelllinie, ATCC CRL 8805
TE FlyA7	TE671 basierte retrovirale amphotrope Verpackungszelllinie, Kitten et al. [135], zur Verfügung gestellt von O. Merten, Généthron

2.4 E.COLI STÄMME

SURE [®]	e14 ⁻ (mcrA), Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC:Tn5 (kan ^R), uvrC, [F'proAB, lac ^q Z Δ M15, Tn10, (tet ^R)]; Greener [137]
DH5 α	F ⁻ , endA1, hsdR17, (r ^{-K} , m ⁺ _k), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, Δ (argF-lac-ZYA)U169, Φ 80lacZ Δ M15; Hanahan [136]

2.5 VERWENDETE COMPUTERPROGRAMME

Diese Arbeit wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm Microsoft Word 97 geschrieben. Abbildungen wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel 97 und Corel Draw 7.0 erstellt. Die Erarbeitung von Primersequenzen und die Erstellung von Plasmidrestriktionskarten erfolgte mit Vector NTI 4.0. Die Auswertungen der cDNA-Arrays wurde mit Imaging Research ARRAY-VISION Vers. 5 und die Bildbearbeitungen mit Corel PhotoPaint 7.0 durchgeführt.

2.6 VERWENDETE MASSENSTANDARDS

2.6.1 PROTEINE

prestained weight range von Gibco BRL

14,3 kD Lysozym; 18,4 kD beta-Lactoglobulin; 29,0 kD Carbonic Anhydrase; 43,0 kD Ovalbumin; 68,0 kD BSA; 97,4 kD Phosphorylase B; 200,0 kD Myosin (H-Kette)

2.6.2 DNA

Lambda HindIII/EcoRI-Marker

21226 bp, 5148 bp, 4973 bp, 4277 bp, 3530 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1330 bp, 983bp, 831 bp, 564 bp 100 bp

Lambda HindIII-Marker

23100 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp, 100 bp

2.7 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.7.1 ARBEITEN MIT *E.COLI*

2.7.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der verwendeten *E.coli*-Stämme (s. Abschnitt 2.4) erfolgte ausschließlich bei 37°C in LB- bzw. TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz. Die Flüssigkulturen wurden unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert und bakterielle Einzelklone auf entsprechenden Agarplatten herangezogen.

2.7.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektrotransformation

Zur Herstellung für die Elektrotransformation geeigneter Bakterien wurden 1 l LB-Medium mit Bakterien des benötigten *E.coli* Stammes angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde bei 37°C und 180 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Inkubation wurde nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 bis 1,0 (vermessen bei 600 nm) abgebrochen und die Suspension für 15 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien bei 1500×g (4°C) pelletiert, das Pellet mit 1,5 l eiskaltem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut mit 20 ml eiskaltem Glycerin gewaschen, anschließend in 3 ml Glycerin gelöst und die erhaltene Suspension aliquotiert (zu je 60 µl). Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nachfolgend bei –70°C gelagert.

2.7.1.3 Transformation von *E.coli*

Für die Elektrotransformation wurden 50 µl kompetenter *E.coli* Zellen (s. Abschnitt 2.7.1.2) mit 1 µl Plasmid-DNA (1 pmol) vermischt. Der Ansatz wurde in sterile Elektrotransformati-
onsküvetten überführt und transformiert (2,5 kV; 25 µF; 200 Ω). Die Suspension wurde in 500 µl SOB-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C und 180 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Entstandene Einzelklone dienten als Ausgangsmaterial zur Plasmid-DNA Isolierung.

2.7.2 ARBEITEN MIT DNA

2.7.2.1 DNA-Minipräparation

nach Birnboim und Doly [138]; modifiziert von G. Morelle, 1987, unveröffentlicht

Mit Hilfe der DNA-Minipräparation können bis zu 20 µg Plasmid-DNA aus 2 ml Bakterienkulturen isoliert werden.

Dazu wurden die Bakterien für 2 min bei 6800×g pelletiert und in 200 µl Zellsuspensionspuffer (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris; pH 8, 4 mg/ml Lysozym) aufgenommen. Die Zellen wurden 5 min bei Raumtemperatur lysiert und anschließend mit 400 µl 1% SDS, 0,2 N NaOH versetzt. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden 300 µl 7,5 M Natriumacetat zugegeben und das Ganze für 10 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden bei 20000×g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und die DNA bei Raumtemperatur gefällt (10 min Inkubationszeit). Das durch Zentrifugation bei 20000×g entstandene DNA-Pellet wurde mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend bei 37°C getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE (10/1) mit 0,5 mg/ml RNaseH gelöst. Ein Aliquot der DNA wurde nachfolgend für eine Restriktionsanalyse eingesetzt.

2.7.2.2 DNA-Maxipräparation

Größere Plasmidmengen (bis 200 µg) wurden mit Qiagen Plasmid Maxi Purification Kits oder durch einen zweifachen CsCl-Gradienten aufgereinigt.

2.7.2.2.1 Qiagen Plasmid Maxi Purification Kits

500 ml Bakterienkultur wurden bei 6000×g und 4°C für 15 min abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. 10 ml Puffer P2 (0,2 N NaOH; 1% SDS) wurden hinzugefügt und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P3 (3 M Kaliumacetat) zugegeben und die Proteine während einer 20 minütigen Inkubation auf Eis gefällt. Das Präzipitat wurde bei 20000×g und 4°C für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter auf die äquilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben. Die an die Säule gebundene DNA wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Isopropanol) gewaschen und anschließend mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl; 15% Isopropanol) eluiert. Durch die Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt und bei 15000×g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Die DNA wurde in TE (10/1) aufgenommen und photometrisch die DNA-Konzentration bestimmt.

2.7.2.2.2 CsCl-Gradient

Die Bakterien einer 200 ml Kultur wurden bei 5000×g und 4°C abzentrifugiert und in 10 ml Zellsuspensionspuffer (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris; pH 8; 0,4 mg/ml Lysozym) aufgenommen und während einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 10 ml 1% SDS; 0,2 N NaOH zugegeben, der Ansatz auf Eis für 5 min inkubiert und die dadurch denaturierten Proteine durch die Zugabe von 10 ml eiskaltem 5 M Kaliumacetat ausgefällt. Das Präzipitat wurde durch 5 minütige Zentrifugation bei 12000×g pelletiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde durch die Zugabe von 0,7 Volumen Iso-

propanol gefällt und 10 min bei 20000×g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml TE (10/10) gelöst und mit 2 M Tris Base neutralisiert. Die DNA-Lösung wurde auf 2,75 ml mit TE (10/10) aufgefüllt und die CsCl- und Ethidiumbromidkonzentration auf 1 mg/ml eingestellt. Der Ansatz wurde 15 min im Dunkeln inkubiert und 10 min bei 12000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Quicksealröhrchen (Beckman) gegeben und über Nacht bei 70000 rpm in einem TLA 100.3 Rotor (Beckman) zentrifugiert. Die entstandene DNA-Bande wurde mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht, abgezogen und mit einer CsCl-Lösung (1 mg/ml in TE (10/10)) auf 2,75 ml aufgefüllt. Die in ein neues Quicksealröhrchen überführte Lösung wurde für 5 Stunden bei 100000 rpm im TLA 100.3 Rotor erneut zentrifugiert und die erhaltene Bande abgezogen. Das Ethidiumbromid wurde mit Hilfe von NaCl gesättigtem Isopropanol extrahiert. Die DNA wurde mit 2,5fachem Volumen Ethanol versetzt und gefällt. Das nach Zentrifugation entstandene Pellet wurde in TE (10/1) aufgenommen, eine Phenol-Chloroform-Extraktion (s. Abschnitt 2.7.2.3) durchgeführt und erneut mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen TE (10/1) aufgenommen und photometrisch die Konzentration bestimmt.

2.7.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zu 100 µl Ansatz (z.B. einer DNA-Lösung) wurden 100 µl Phenol gegeben und gut gemischt. Anschließend wurden 100 µl 24:1 Isoamylalkohol/Chloroform dazugegeben und nochmals kräftig gemischt. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 10000×g in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 100 µl Chloroform versetzt. Das Ganze wurde gut gemischt und für 5 Minuten bei 10000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das 2,5fache Volumen Ethanol und 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,0) dazugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei 4°C ein halbe Stunde bei 10000×g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde bei 37°C im Inkubationsblock getrocknet und in TE (10/1) aufgenommen.

2.7.2.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde eine 1:100 Verdünnung der vorliegenden DNA-Lösungen hergestellt und in Quarzküvetten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm vermessen. Dabei sollten die Meßwerte bei 260 nm ungefähr doppelt so hoch sein wie bei 280 nm. Die DNA-Konzentration ergibt sich dann aus folgender Formel:

$$(\text{OD}_{260} - \text{OD}_{280}) \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{OD} \quad (1 \text{ OD entspricht } 50 \mu\text{g/ml})$$

2.7.2.5 DNA-Restriktionsspaltungen

Analytische Spaltungen von Plasmid-DNA wurden für die Charakterisierung isolierter Plasmide eingesetzt. Diese Kontrollspaltungen wurden nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt, wobei sich abhängig vom verwendeten Enzym oder der verwendeten DNA Änderungen ergeben können.

20 µl Gesamtansatz: 1 µg DNA
5 U Enzym
2 µl Enzympuffer (+ BSA)
+ Wasser auf 20 µl

Der Ansatz wurde bei der optimalen Temperatur für das Enzym mindestens 1½ Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die dann ermittelten Bandengrößen mit den erwarteten Größen verglichen. Als Marker wurden HindIII gespaltene Lambda-DNA und HindIII/EcoRI gespaltene Lambda-DNA eingesetzt.

2.7.2.6 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von gespaltenen und ungespaltenen Plasmiden wurden ausschließlich Agarosegele verwendet. Je nach der Größe der zu erwartenden Fragmente wurden Gele mit 0,5% bis 1,5% Agaroseanteil (w/v) benutzt. Der Gellauf erfolgte meist bei 100 Volt in 1×TAE-Laufpuffer. Zur Abschätzung der Größe der DNA-Banden diente ein Lambda HindIII und/oder Lambda HindIII/EcoRI Marker (s. Abschnitt 2.6.2).

2.7.3 ARBEITEN MIT RNA

2.7.3.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellkulturen

Die Isolierung der RNA für die cDNA Expression Arrays erfolgte nach der im folgenden beschriebenen Methode, die der Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen dient. Dazu wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² kultiviert.

Von den Zellen wurde das Kulturmedium sorgfältig entfernt und der Zellmonolayer mit 5 ml TRI-REAGENT LS (MRC Molecular Research Center) überschichtet. Mit einer Pipette wurden die Zellen von dem Zellkulturflaschenboden abgespült und die restlichen am Boden haftenden Zellen mit einem Schaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde quantitativ in ein 10 ml PV-Röhrchen überführt und auf 6,6 ml mit Wasser aufgefüllt (ein Viertel des Gesamtvolumens sollte aus Wasser bestehen).

Zu dem Ansatz wurden 0,1 Volumen BCP (1-bromo-3-chloro-propane, MRC Molecular Research Center) gegeben und das Ganze vorsichtig gemischt (nicht vortexen!). Der Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 4°C und 12000×g zentrifugiert (alternativ 30 min bei geringerer g-Zahl).

Der wäßrige RNA-haltige Überstand wurde abgenommen, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C und 12000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Pellet zweimal mit 75%igen Ethanol gewaschen (Zentrifugation je 1 min bei 4°C und 12000×g). Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet bei 37°C getrocknet und in 50 µl Wasser

aufgenommen. Das Pellet wurde für 5 min bei 37°C geschüttelt und anschließend resuspendiert.

Für eine Langzeitlagerung kann das Pellet im 75%igen Ethanol bei –70°C weggefroren werden. Falls eine starke Verunreinigung mit DNA wahrscheinlich ist (ausgedehnte weiße DNA-Interphase), wird eine zweite Extraktion empfohlen.

2.7.3.2 DNA-Verdau zur Entfernung von DNA-Kontaminationen aus RNA-Lösungen

Zur Eliminierung von geringen DNA-Kontaminationen in aufgereinigten RNA-Lösungen wurde ein DNA-Verdau durchgeführt.

Der Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

50 µl RNA-Lösung (5 µg RNA)

129 µl Wasser

20 µl 10× DNase I Puffer

0,5 µl DNase I (10 U/µl; Roche)

und wurde für 30 min bei 37°C inkubiert.

2.7.3.3 Entfernung von DNase I aus RNA-Lösungen

Nach Abschluß eines DNA-Verdaus wurde der Ansatz mit Wasser auf 250 µl aufgefüllt, mit 750 µl TRI-REAGENT LS versetzt und vorsichtig durchmischt (nicht vortexen!). Der Ansatz wurde anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß an die Inkubationszeit wurden 100 µl BCP (1-bromo-3-chloro-propane, MRC Molecular Research Center) zugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei 4°C und 12000×g zentrifugiert, der RNA-haltige wäßrige Überstand abgenommen und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Zur Fällung der RNA wurde der Ansatz für 15 min bei 4°C aufbewahrt und die gefällte RNA für 15 min bei 4°C und 12000×g abzentrifugiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde zweimal mit

75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser aufgenommen (bei großen Pellets 10 µl, sonst 3 bis 6 µl).

2.7.4 GEN-EXPRESSIONSANALYSE

Für die Analyse der Regulation der Genexpression, hervorgerufen durch z.B. virale Infektion oder Änderungen der Kultivierungsbedingungen der Zellen, wurden sogenannte cDNA-Microarrays verwendet. Dabei kam das cDNA Atlas System von Clontech zum Einsatz.

2.7.4.1 Atlas, Clontech

Bei dem verwendeten cDNA Microarray von Clontech handelt es sich um eine Nylonmembran, auf die circa 1200 Oligonucleotide punktuell aufgebracht wurden. Jede einzelne Sequenz ist einem bestimmten Gen zugeordnet und an diese Sequenzen können spezifisch zugehörige radioaktiv markierte cDNA's binden. Je nach Expressionsstärke des jeweiligen Gens wird eine mehr oder weniger große Anzahl der markierten cDNA's gebunden, die dann mit Hilfe der Radioaktivität der cDNA quantifiziert werden kann.

Für die Untersuchungen zur Genexpression wurde aus eukaryotischen Zellkulturen Gesamt-RNA isoliert, anschließend eventuell vorhandene Reste von chromosomaler DNA mittels DNase I-Behandlung entfernt und die RNA nochmals aufgereinigt (s. Abschnitte 2.7.3.1 bis 2.7.3.3).

2.7.4.1.1 cDNA-Synthese

Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA und zum Annealing der Primer für die cDNA-Synthese wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

2 µl RNA (4,5 µg)
1 µl CDS Primer.

Das RNA-Primer-Gemisch wurde zwei Minuten bei 70°C und anschließend für zwei Minuten bei 50°C inkubiert.

Für die cDNA-Synthese wurde folgender Ansatz entsprechend dem Protokoll des Herstellers zusammenpipettiert:

2 µl 5× Reaktions-Puffer
1 µl 10× dNTP Mix (5 mM)
3,5 µl [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl)
0,5 µl 100 mM DTT
0,5 µl Wasser.

8 µl dieses Ansatzes sowie 0,5 µl Superscript (200 U/µl) wurden, direkt im Anschluß an die oben erwähnte Inkubation bei 50°C, zu dem RNA-Primer-Gemisch gegeben und für 25 min bei 50°C inkubiert. Die cDNA-Synthese wurde durch Zugabe von 1 µl 10× Termination Mix abgestoppt.

Bemerkung: Der CDS-Primer-Mix enthält spezifische Primer für die Gene, die auch auf dem cDNA Microarray vorhanden sind.

2.7.4.1.2 Aufreinigung der synthetisierten cDNA

Die radioaktiv markierte cDNA wurde mit Hilfe von NucleoSpin Extraction Spin Columns aufgereinigt.

Der Ansatz wurde mit NT2 Bindungspuffer auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und auf die Extraktionssäule gegeben. Die Lösung wurde bei 20800×g für eine Minute durch die Säule in ein 2 ml Eppendorfgefäß zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule dreimal mit dem Waschpuffer NT3 gewaschen (Zentrifugation jeweils für 1 min bei 20800×g). Die Elution der gebundenen cDNA erfolgte mit 100 µl Elutionspuffer NE, der für 3 min auf die Säule gege-

ben und durch die Säule zentrifugiert wurde. Die Radioaktivität der Säule und der einzelnen Lösungen nach dem Säulendurchlauf wurde bestimmt, um den Anteil der in die cDNA eingebauten Radioaktivität zu ermitteln.

2.7.4.1.3 Hybridisierung der cDNA

Vor der Hybridisierung der cDNA Probe wurde die Array-Membran für eine Stunde bei 68°C mit folgender Lösung abgesättigt:

5 ml Hybridisierungslösung ExpressHyb, Clontech (auf 68°C vorgewärmt)
0,5 mg denaturierte Heringssperma DNA (5 min 95°C, sofort auf Eis).

Während der Absättigung der Membran wurde die cDNA-Probe vorbereitet. Dazu wurde die Probe (~ 100 µl) mit 11 µl 10× Denaturierungslösung (1 M NaOH; 10 mM EDTA) versetzt und für 20 min bei 68°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zu diesem Ansatz 5 µl C₀t-1 DNA und 116 µl 2× Neutralisierungslösung (1 M NaH₂PO₄; pH 7) zugegeben und für 10 min bei 68°C inkubiert.

Nach Abschluß der Absättigung der Membran wurde die aufbereitete Probe in die Absättigungslösung gegeben (nicht direkt auf die Membran) und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4× für je 30 min mit vorgewärmter Waschlösung I (2×SSC; 1% SDS) und 1× mit Waschlösung II (0,1×SSC; 0,5% SDS) bei 68°C gewaschen. Nach Abschluß der Waschschrte wurde die Membran für mindestens 5 min in 2×SSC bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Membran wurde anschließend luftdicht in Frischhaltefolie verpackt und auf einem Phosphorimager Screen exponiert. Die Expositionszeit betrug je nach Stärke der Radioaktivität 6 Stunden bis 3 Wochen.

2.7.4.1.4 Auswertung des Microarrays

Der Phosphorimager Screen wurde mit einem FUJI BAS 2500 Scanner gescannt und der Microarray mit Hilfe der Computerprogramme Imaging Research ARRAY-VISION Vers. 5

und Microsoft Excel 97 ausgewertet. Für vergleichende Expressionsanalysen wurde die Stärke der Hybridisierung durch die Intensität verschiedener auf dem Array vorhandener Haushaltsgene und der Gesamtintensität der einzelnen Arrays abgeglichen. Der Hintergrund wurde für jeden einzelnen Punkt des Microarrays ermittelt.

2.8 ARBEITEN MIT PROTEINEN

2.8.1 SDS-PAGE

2.8.1.1 Probenaufarbeitung

Eukaryotische Zellkulturen wurden mit NE-Puffer abgelöst und gezählt. Je 1×10^6 Zellen wurden bei $180 \times g$ für 5 min abzentrifugiert, in 1 ml $1 \times$ PBS aufgenommen und in RiboLyser Tubes von Hybaid gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 upm für 20 s homogenisiert. 700 μl der erhaltenen Zellsuspension wurden in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und erneut für 5 min bei $180 \times g$ zentrifugiert, um größere Zelltrümmer zu pelletieren.

250 μl des Zelllysates wurden mit 1250 μl 100%igen Ethanol versetzt und für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden bei 4°C und $20000 \times g$ abzentrifugiert und das entstandene Pellet in 20 μl Probenpuffer (64 mM Tris; 1,3% SDS; 30 mM DTE; 17% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; pH 6,7) aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C inkubiert und gut gemischt. Anschließend wurden sie für 1 min bei $20000 \times g$ zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf ein Proteingel aufgetragen.

2.8.1.2 Proteingel

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein 12%iges denaturierendes Polyacrylamid-Gel verwendet. Zur Konzentrierung der Proteine wurde das Trenngel mit einem sogenannten Sammelgel überschichtet. Die einzelnen Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel: 4,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 40%
4 ml lower Tris (1,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 8,8)
30 µl TEMED
30 µl APS (40%)
6,5 ml dest. Wasser

Sammelgel: 1 ml Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 40%
3 ml upper Tris (0,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 6,7)
20 µl TEMED
20 µl APS (40%)
6 ml dest. Wasser

Der Gellauf durch den Bereich des Sammelgels erfolgte bei 75 V und der Trenngellauf bei 150 V.

2.8.2 WESTERN BLOT

Zur Quantifizierung und zur Detektion spezifischer Proteine in den Proben wurde ein „semi-dry“ Western Blot durchgeführt. Dazu wurde mit Blotpuffer (25 mM Tris; 0,19 M Glycin; 20% Methanol) getränktes 3MM Whatman-Papier auf die untere Platte gelegt (luftblasenfrei). Darauf wurde eine ebenfalls angefeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt. Das Proteingel wurde mit Hilfe eines Spatels vorsichtig abgelöst, auf ein getränktes 3MM Whatman-Papier transferiert und auf die Membran gelegt. Das Blotten erfolgte bei 0,18 A für 1 Stunde. Im Anschluß kann mit dem Proteingel noch eine Proteinfärbung durchgeführt werden.

Zum Blockieren unspezifischer Antikörperreaktionen wurde die Membran in Absättigungslösung (3% BSA; 0,9% NaCl; 10 mM Tris; 10% Pferdeserum; pH 7,4) bei 42°C für 1 Stunde inkubiert. Dann erfolgte die Inkubation der Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem 1. Antikörper und nachfolgend mit dem 2. Antikörper. Nach den Inkubationen mit den jeweiligen Antikörperlösungen wurde die Membran jeweils 3× für 10 min mit 1×TBS gewaschen.

Zur Detektion der Peroxidase gekoppelten 2. Antikörper wurde die entsprechende Substratlösung (0,3% 4-Chloro-1-Naphtol; 0,15% H_2O_2 in 1×PBS) auf die Membran gegeben, bis die Banden sichtbar waren. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.8.3 DOT BLOT

Nachdem eine Charakterisierung von Proteinen durch SDS-PAGE und Western Blotting stattgefunden hat, kann die Quantifizierung ebenfalls durch einen sogenannten Dot Blot erfolgen.

10 bis 100 µl Probenmaterial wurden mit 1×TBS 1:10 verdünnt und auf Eis gelagert. Die Dot Blot Apparatur (BioRad) wurde an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und eine Nitrocellulosemembran eingelegt, die vorab 30 Sekunden in 1×TBS eingeweicht wurde. Nicht benötigte Bereiche der Apparatur wurden mit Parafilm abgedeckt. Die Bereiche für die Probenaufnahme wurden mit 200 µl 1×TBS gespült, anschließend wurden die Proben aufgetragen und durch die Membran gesogen. Abschließend wurde noch einmal mit 200 µl 1×TBS gespült.

Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte wie unter Abschnitt 2.7.5.2 beschrieben.

2.8.4 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

BCA Protein Assay Kit von Pierce

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Proben wurde ein Aliquot entnommen, 1:10 verdünnt und 20 µl davon in eine Vertiefung einer 96 Lochplatte gegeben (in Dreifachbestimmung). Die Proben wurden mit 180 µl der Arbeitslösung (Reagenz A und Reagenz B 50:1 v/v gemischt) versetzt und gut gemischt.

Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und nach der Inkubationszeit auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 562 nm vermessen. Als Standard dienten verschiedene Konzentrationen einer BSA-Stocklösung.

2.8.5 ANTIKÖRPERPRODUKTION

Für die Envelope Antikörper wurden Hyb 83A25 Zellen von Evans et al. [86] ohne Feederzellen aufgetaut. Es handelt sich dabei um Suspensionszellen, die in RPMI mit 10% FCS kultiviert werden. Für die Antikörperproduktion wurde IgG-freies FCS (GibcoBRL) verwendet. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand langsam mit 29,1 g Ammoniumsulfat/100 ml Überstand bei 4°C versetzt. Anschließend wurde der Ansatz für weitere 60 min gerührt. Die gefällten Proteine wurden bei 4°C für 1h bei 27000×g zentrifugiert und das Pellet in 1×PBS aufgenommen. Um die hohen Salzkonzentrationen zu verringern, wurde eine Dialyse gegen 1× PBS (3× wechseln, mit je 1l) durchgeführt. Die Antikörperlösung wurde anschließend aliquotiert und bei –20°C eingefroren.

2.9 ARBEITEN MIT EUKARYOTISCHEN ZELLKULTUREN

2.9.1 KULTIVIERUNG VON EUKARYOTISCHEN ZELLKULTUREN

Die Kultivierung der in Abschnitt 1.3 aufgeführten Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxidgehalt in DME-Kulturmedium. Die Zellen wurden zur Stammhaltung in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² gehalten und zweimal wöchentlich passagiert (s. Abschnitt 2.9.2).

2.9.2 PASSAGIEREN DER ZELLEN

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgezogen und NE-Puffer auf die Zellen gegeben (für eine Fläche von 25 cm² je 1 ml). Die Inkubation erfolgte, bis die Zellen sich sichtbar vom Flaschenboden lösten. Die restlichen noch adhärenen Zellen wurden vom Boden abgeschlagen. Zu den Zellen wurde daraufhin mindestens das gleiche Volumen an DME-Medium gegeben und die Zellen vereinzelt. Je nach Bedarf und Gegebenheit wurden entsprechende Aliquots in neue mit Medium gefüllte Zellkulturflaschen oder -platten gegeben.

2.9.3 KRYOKONSERVIERUNG VON EUKARYOTISCHEN ZELLKULTUREN

Die Kryokonservierung dient der Langzeitlagerung von Zelllinien bei –196°C.

Die Zellen einer zu 80 bis 90% bewachsenen Zellkulturflasche wurden mit NE-Puffer abgelöst, sorgfältig resuspendiert und bei 175×g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskaltem Einfriermedium (95% FCS, 5% DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen aliquotiert. Nachdem die Zellen langsam auf –70°C abgekühlt wurden (in Isopropanol gefüllten Einfrierboxen von Nalgene), erfolgte die Überführung der Röhrchen in flüssigen Stickstoff.

2.9.4 AUFTAUEN VON ZELLEN

Bei -196°C gelagerte Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in vorgewärmten Kulturmedium verdünnt (1:5 bis 1:10) und für 5 min bei $175\times g$ abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.

2.9.5 TRANSFEKTIONSMETHODEN

2.9.5.1 Calciumphosphat-Methode

Für die stabile Transfektion von Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion die entsprechenden Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^6 in kleinen Flaschen (25 cm^2 Fläche) ausplattiert. Vier Stunden vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Pro kleine Flasche wurde ein Calciumphosphat-DNA-Präzipitat von 0,5 ml eingesetzt. Pro 0,5 ml Ansatz wurden 250 μl 2 \times HEBS in ein 10 ml Polystyrol-Röhrchen und in einem extra Röhrchen 50 μl 2,5 M Calciumchloridlösung, 5 μg Plasmid-DNA und 5 μg Carrier-DNA gegeben und mit Wasser auf 250 μl aufgefüllt. Unter starkem Mischen der 2 \times HEBS-Lösung wurde tröpfchenweise die DNA-Calciumchlorid-Lösung dazugegeben. Anschließend folgte die Inkubation des sich bildenden Präzipitates für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Präzipitat vorsichtig in das Medium zu den Zellen gegeben. Der Austausch des präzipitathaltigen Mediums durch frisches Kulturmedium erfolgte einen Tag nach der Transfektion.

2.9.5.2 Selektion auf stabile Klone

Mit der Selektion auf stabile Transfektionsereignisse wurde 48 Stunden nach der Transfektion begonnen. Dazu wurde das Kulturmedium gegen Selektionsmedium mit den aus Tabelle 2.1 zu entnehmenden Konzentrationen des Selektionsagents ausgetauscht. Für einen Zeitraum

von circa 2 Wochen wurde alle 2-3 Tage das Selektionsmedium gewechselt. Die Selektion war nach dem Absterben der Negativkontrolle abgeschlossen.

Tabelle 2.1: Verwendete Konzentrationen der Selektionsagentien zur Etablierung stabil transfizierter Zellklone

Zelllinie	G418 Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	MTX Konzentration [ng/ml]
NIH3T3	1000	125
BHK-A	1500	125
BHK21B	1500	-

2.9.6 ARBEITEN MIT RETROVIREN

2.9.6.1 Produktion

Zur Virusproduktion wurden standardmäßig virusproduzierende Zellen einer zu circa 90% bewachsenen Zellkulturflasche verwendet. Die 24 stündige Produktion erfolgte in DME-Kulturmedium. Der virushaltige Zellüberstand wurde durch einen 0,45 μm Filter gegeben und anschließend für die entsprechenden Untersuchungen eingesetzt.

2.9.6.2 Aufkonzentrierung

Für einige experimentelle Fragestellungen war es notwendig, die Retroviren aufzukonzentrieren. Dieses erfolgte durch Ultra- oder Größenausschlußzentrifugation.

Für die Aufkonzentrierung mit Hilfe der Ultrazentrifugation wurden bis zu 10 ml virushaltiger Überstand für 2 Stunden und 4°C bei 30000 rpm in einem SW40Ti Rotor (Beckman) zentrifugiert und das Viruspellet in entsprechenden Volumen Reaktionspuffer aufgenommen.

Alternativ erfolgte die Aufkonzentrierung der Viren über Größenausschlußzentrifugation mit CentriPreps von Amicon nach dem Protokoll des Herstellers. Dieses System kann gleichzeitig für einen Pufferwechsel verwendet werden.

2.9.6.3 Titerbestimmung

Mit Hilfe von Endpunkttiterungen und der Methode nach Spearman (1908) und Kaerber (1931) wurde die Anzahl infektiöser Retroviren in virushaltigen Zellüberständen bestimmt [82, 83].

Für erstere Methode wurden am Vortag 6000 Zellen (NIH3T3) pro Loch einer 24-Lochplatte ausgesät. Der filtrierte virushaltige Überstand (s. Abschnitt 1.9.6.1) wurde in die Vertiefungen der Platte gegeben und seriell in DME mit 8 µg/ml Polybrene verdünnt (Verdünnungsstufen 1:10). 24 Stunden nach der Infektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und 48 Stunden nach der Infektion mit der Selektion (G418) auf infizierte Zellen begonnen. Nach circa 10 Tagen Selektion wurden die entstandenen Zellklone mit einer Kristallviolettlösung (5 g/l Kristallviolett; 150 mM NaCl; 5% Formaldehyd in 50% Ethanol) gefärbt und die Titerung ausgewertet (s. Formel 2.1). In die Formel wurde die letzte Verdünnung mit einem angefärbten Zellklon und die Gesamtzellzahl der virusproduzierenden Zellen einbezogen:

$$Titer[cfu/10^6 \text{ Zellen}] = \frac{\text{Verdünnung} \times \text{Produktionsvolumen} \times 10^6}{\text{Gesamtzellzahl}} \quad (2.1)$$

Für die Titerbestimmung und die anschließende Auswertung nach der statistischen Methode von Spearman und Kaerber wurden pro Vertiefung einer 96-Lochplatte 1000 Zellen ausgesät und wie oben beschrieben weiter behandelt.

Die Titerbestimmung der TE FlyA7 produzierten Viren erfolgte auf HT1080 und die infizierten Zellen wurden mit Hilfe des β-Galactosidase Assays angefärbt. Zur Färbung der Zellen wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit kaltem 1×PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen. Dazu wurde die eiskalte Fixierlösung (Methanol/Aceton-Lösung 1:1) auf die Zellen gegeben und diese 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde abgezogen und der Zellrasen gut an der Luft getrocknet. Dann wurde die kalte Färbelösung (5 mM K₃FeIII(CN)₆; 5 mM K₃FeII(CN)₆; 2 mM MgCl₂; 100 µg/ml X-Gal in PBS; pH 7,1) zu den Zellen gegeben und der Reaktionsansatz über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskopes.

2.9.6.4 Stabilitätsuntersuchungen

Für die Untersuchungen der produzierten Viren auf ihre physikochemische Stabilität, wurden die Retroviren bei 32°C und 37°C produziert (24 Stunden) und anschließend bei 4°C und Raumtemperatur (20°C) gelagert. Von den Proben wurde der Titer nach 0, 1, 2, 4, 8, 16 und 32 Tagen bestimmt.

2.9.6.5 Berechnungen der viralen Halbwertszeiten

Für die Bestimmung des Zeitpunktes zu dem die Hälfte der anfänglich vorhandenen infektiösen Viren nicht mehr aktiv war, wurden die Titer der gelagerten Proben über die Zeit aufgetragen und die Kurvengleichungen mit Hilfe von Sigma Plot 5.0 ermittelt. Die Gleichungen dienten zur Berechnung der viralen Halbwertszeiten.

2.9.6.6 Bestimmung der Anzahl physischer retroviraler Partikel

2.9.6.6.1 Realtime-PCR

Für die Quantifizierung physischer retroviraler Partikel wurde der Lightcycler von Roche verwendet. Der LightCycler ist ein PCR-Gerät, bei dem online der Verlauf der DNA-Amplifikation verfolgt werden kann. Dazu wird nach jedem PCR-Zyklus die Stärke der Fluoreszenz im Reaktionsansatz gemessen, die durch die Anregung des zwischen den DNA-Doppelsträngen interkalierten SYBR-Green mit Laserlicht entsteht. Die Stärke des detektierten Signals hängt damit von der Konzentration der DNA ab.

Für die DNA-Quantifizierung wird der PCR-Zyklus bei dem die erste Fluoreszenz gemessen wird, herangezogen. Je höher die Ausgangskonzentration der DNA in der zu messenden Probe ist, um so früher tritt die erste meßbare Fluoreszenz auf. Neben der Quantifizierung ist es möglich, mit Hilfe von Schmelzpunktanalysen die Qualität des gebildeten Produktes und die Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen.

2.9.6.6.1.1 Analyse der retroviralen strong-stop cDNA

nach Towers et al. [84]

Circa ein Prozent der gebildeten viralen Partikel enthält eine kurze cDNA-Sequenz, die sogenannte strong-stop DNA, die von der viralen RT nach dem Entlassen der Virionen aus der Zelle aber noch vor Infektion einer Wirtszelle amplifiziert wird. Die gebildete strong-stop cDNA bildete die Grundlage der Quantifizierung von Viruspartikeln [90].

Für die Untersuchungen wurde das Protokoll von Towers et al. [84] für den LightCycler optimiert.

Als Standard für die Quantifizierung diente ein charakterisierter virushaltiger Überstand mit $2,5 \times 10^8$ viralen Partikeln/ml (zur Verfügung gestellt von O. Merten, Généthon). Der Standard und die Proben wurden 10 min bei 75°C inkubiert, um die Retroviren aufzuschließen. Im Anschluß an die Inkubationszeit wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 10 µl Standard bzw. 1:10 mit Wasser verdünnte Probe; 2 µl LightCycler-DNA Master SYBR Green I; 3,2 µl 25 mM MgCl₂; 0,16 µl Antikörper (anti-Taq); 0,4 µl Primer FPG und RPG (25 pmol/µl); 4,24 µl Wasser. Der Ansatz wurde in eine Glaskapillare überführt und im Lightcycler für 2 min bei 95°C inkubiert. Anschließend folgten 60 Zyklen die aus sich aus der Denaturierung (0 s, 94°C), dem Annealing (10 s, 60°C) und der Elongation (10 s, 72°C) zusammensetzten.

Primersequenzen: FPG ATTGACTGAGTCGCCCCGG (forward primer)
 RPG AGCGAGACCACAAGTCGGAT (reverse primer)
 Amplifizieren 72 bp aus der strong-stop cDNA.

2.9.6.6.2 Virusfärbung

Die Färbung viraler Partikel diente ihrer Visualisierung mittels einfacher etablierter fluoreszenzmikroskopischer Methoden. Durch diese kann die Bindung der Retroviren an Zelloberflächen gezeigt werden aber sie können auch für die Quantifizierung von physischen viralen Partikel eingesetzt werden.

2.9.6.6.2.1 Immunhistochemische Envelope-Färbung

nach Pizzato et al. [7], modifiziert

Für die Färbung des Envelope-Proteins von 4070A-MLV wurden 195 µl virushaltiger Zellüberstand (filtriert; 0,45 µm) mit 4 µl Polybrene (0,4 mg/ml) und 1 µl Texas Red markierter Fluoreszenzpartikel (Firma, Durchmesser 100 nm, $3,6 \times 10^7/\mu\text{l}$) vermischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur in 8-Loch Chamber-Slides inkubiert. Mit Hilfe des Polybrenes werden die Viren an die Glasoberfläche fixiert. Anschließend wurden die Präparate einmal mit Waschlösung gewaschen (1× PBS; 1% BSA; 1% FCS; 0,1% Tween20) und 15 min bei Raumtemperatur unspezifische Bindungen abgesättigt (1× PBS; 1% BSA; 1% FCS). Nach der 45 minütigen Inkubation mit dem ersten Antikörper (rat anti env, 83A25 von Evans et al. [86]) wurden die Proben fünfmal mit Waschlösung gewaschen. Im Anschluß an die Waschschrte erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (goat anti rat, FITC markiert, Sigma) für 45 Minuten und anschließend wurden die Proben erneut gewaschen (s. oben). Die Präparate wurden zum Abschluß mit Fluoreszenzeinschlußmedium (Dako) überschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt.

2.9.6.6.2.2 Färbung der viralen Membranen

Zur systematischen Quantifizierung von Viren, die mit der Plasmamembran der Wirtszelle umhüllt sind, wurde eine Färbungsmethode entwickelt, die unabhängig von Antikörpern ist, da gezielt das Cholesterin der viralen Membran fluoreszenzmarkiert wird. Filipin ist ein Antibiotikum, das auf die Membran-Sterine eukaryotischer Zellen wirkt, wobei es zu Änderungen der Membranpermeabilität kommt. Aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften und spezifischen Bindung an Cholesterin kann es zur Anfärbung von cholesterinhaltigen Membranen verwendet werden.

Für die Färbung wurden 195 µl virushaltiger Zellüberstand (filtriert; 0,45 µm) mit 4 µl Polybrene (0,4 mg/ml) und 1 µl Texas Red markierter Fluoreszenzpartikel (Molecular Probes, Durchmesser 100 nm, $3,6 \times 10^7/\mu\text{l}$) vermischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur in 8-Loch Chamber-Slides inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben dreimal mit 1×PBS gewaschen, 10 min mit Glycin (1,5 mg/ml) und anschließend 30 min mit Filipin (0,05 mg/ml) inkubiert.

Die Präparate wurden dreimal mit 1×PBS gewaschen, mit Fluoreszenzeinschlußmedium (Dako) überschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt.

2.9.6.6.2.3 Quantifizierung gefärbter Retroviren

Die Bestimmung der Anzahl der viralen Partikel eines virushaltigen Zellüberstandes erfolgte mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (1000× Vergrößerung, 100er Ölimmersionsobjektiv). Die Visualisierung der Fluoreszenzpartikel erfolgte mit Filtern der Wellenlängen 595 / 615 und der FITC markierten Viren bei 495 / 520 (Anregung / Emission).

Die Filipinsignale konnten mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes detektiert werden (Filter Set XF113 von Omegafilters, Anregung 387 nm (28), Emission 450 nm (58)).

Für die Quantifizierung wurde gleiches Bindungsverhalten von Fluoreszenzpartikeln und Viren an die Glasoberfläche von Chamber-Slides vorausgesetzt [7] und durch die bekannte Anzahl von Fluoreszenzpartikeln in einer Probe die Konzentration an viralen Partikeln berechnet.

2.9.6.7 Färbung der Virusbindung an Zelloberflächen

Die in den Abschnitten 2.9.6.6.2.1 und 2.9.6.6.2.2 beschriebenen Methoden zur Färbung viraler Partikel lassen sich in modifizierter Form zum Nachweis der Bindung der Retroviren an Zelloberflächen einsetzen.

2.9.6.7.1 Immunhistochemische Färbung der Bindung von Viren an Zelloberflächen

Für den Nachweis der viralen Bindung wurden NIH3T3-Zellen in Chamber-Slides ausgesät (zu 70-80% bewachsen). Die Zellen wurden zweimal mit 1×PBS gewaschen und mit virus-haltigem Zellüberstand, der mit Polybrene versetzt wurde (8 µg/ml), überschichtet. Die Zellen wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend 5× mit Waschlösung (1×PBS; 1% BSA; 0,1% Tween20) gewaschen. Anschließend wurden die Proben 15 min mit 4%

Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Im Weiteren wurde wie unter 2.9.6.6.2.1 beschrieben vorgegangen nur mit der Veränderung, daß vor der Überschichtung der Präparate mit Einschlußmedium die Proben zusätzlich einmal mit destilliertem Wasser gewaschen wurden.

2.9.6.7.2 Virusbindung mit Filipin gefärbten Viren

Für den Nachweis der Virusbindung an Zellen wurden die Viren vorab mit Filipin gefärbt und anschließend pelletiert, um zu verhindern, daß sich das Filipin auch an das Cholesterin der Zellmembran anlagert.

Dazu wurden 8 ml virushaltiger Zellüberstand mit Filipin (0,05 mg/ml) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Viren 2 Stunden bei 4°C und 30000 rpm im SW40 Rotor (Beckman) pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt und das Viruspellet in 200 µl DME ohne FCS aufgenommen.

NIH3T3-Zellen, die einen Tag vorher in einem 8-Loch Chamber-Slide ausgesät wurden, wurden mit DME-Medium, das kein FCS enthielt, dreimal gewaschen und mit 200 µl FCS-freiem DME (plus 8 µg/ml Polybrene) überschichtet. Dazu wurden 50 µl der filipingefärbten Viren gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Präparate 3× mit 1×PBS gewaschen und 20 min mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 1×PBS gewaschen, mit Einschlußmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt.

2.9.6.8 Bestimmung der Proteaseaktivität in Zellkulturüberständen

Zur Untersuchung des Proteasegehaltes von Zellkulturüberständen wurde der EnzChekTM Protease Assay von Molecular Probes verwendet.

20 µl Überstand wurden mit 1×Spaltungspuffer auf 100 µl aufgefüllt und anschließend 100 µl BODIPY Casein Arbeitslösung (10 µg/ml BODIPY Casein in 1×Spaltungspuffer) zugegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Fluorimeter vermessen (Anregung 485 nm; Emission 530 nm).

2.9.6.9 Fluoreszenzdurchflußcytometrie

Für die Quantifizierung gfp-exprimierender Zellen wurde ein FACS vantage Gerät (Becton Dickinson) verwendet. Damit lassen sich sowohl die Höhe der gfp-Expression als auch die Anzahl der gfp-positiven Zellen bestimmen.

Adhärente Zellen wurden mit NE-Puffer abgelöst, in EPICS-Medium (2% FCS in 1×PBS) aufgenommen und sehr sorgfältig vereinzelt. Die Zellen wurden bei 180×g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 400 µl EPICS-Medium mit 0,5 µg/ml Propidiumiodid resuspendiert. Das Propidiumiodid färbt nekrotische Zellen an, so daß die gfp-Quantifizierung spezifisch für lebende Zellen erfolgen kann. Die Zellen wurden im FACS-Gerät im FL1 Kanal (gfp) und FL3 Kanal (Propidiumiodid) vermessen.

2.10 ARBEITEN MIT CHOLESTERIN

2.10.1 ENZYMATISCHE CHOLESTERINBESTIMMUNG DES ZELLULÄREN CHOLESTERINGEHALTES

Zur Bestimmung des Cholesteringehaltes von Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, wurden adhäre Zellen (90 bis 100% bewachsene 25 cm² Zellkulturflasche) mit NE-Puffer abgelöst, in 5 ml Medium aufgenommen und die Anzahl der Zellen bestimmt.

Die Zellen wurden für 5 min bei 180×g abzentrifugiert und das Medium vorsichtig abgesaugt. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml hyperosmotischem Puffer resuspendiert (15 mM KCl; 1,5 mM Mg-Acetat; 1mM DTT; 10 mM Hepes-KOH pH 7,5) und auf Eis für 5 bis 10 min inkubiert. Die Zellsuspension wird in RiboLyser Tubes von Hybaid gegeben und die Zellen bei 4000 upm für 20 s im RiboLyser homogenisiert.

Eine definierte Menge der homogenisierten Zellen oder der Virussuspension wurde abgenommen und das Cholesterin mit dem zweifachen Volumen eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2:1 v/v) aus den Membranen extrahiert. Der Ansatz wurde für 5 min mit 2000×g

zentrifugiert, die untere organische Phase abgenommen und in ein Reagenzglas überführt. Die Proben wurden anschließend mit Hilfe von ausströmender Luft getrocknet.

Der Cholesteringehalt der Membran wurde mit Hilfe des InfinityTM Cholesterol Kits von Sigma bestimmt. Sofort nach der Trocknung der Proben wurde 1 ml Cholesterol-Reagenz (0,3 U/ml Cholesterin Oxidase; 0,1 U/ml Cholesterin Esterase; 1 U/ml Peroxidase; 30 nmol/ml p-Hydroxybenzen-Sulfonat pH 6,5) zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die OD wurde bei 500 nm vermessen und der Cholesteringehalt mit Hilfe der Standards berechnet.

2.10.2 BESTIMMUNG DES CHOLESTERINGEHALTES RETROVIRALER MEMBRANEN

Zur Bestimmung des Cholesteringehaltes von Retroviren wurden 10 ml virushaltiger Zellüberstand aufkonzentriert und in 200 µl 1×PBS aufgenommen (s. Abschnitt 2.9.6.2). Die Virussuspension wurde im Anschluß wie die zellulären Proben in Abschnitt 2.10.1 behandelt.

2.10.3 FÄRBUNG VON ZELLULÄREM CHOLESTERIN MIT FILIPIN

nach J.Z. Gu et al. [87]

Für die Färbung von zellulärem Cholesterin wurde ebenfalls Filipin verwendet.

Dazu wurden Zellen in Chamber-Slides ausgesät und bei 32°C oder 37°C für unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluß dreimal mit 1×PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gründlich mit 1×PBS gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit Glycin inkubiert (1,5 mg/ml in PBS), die Glycinklösung sorgfältig entfernt und die Zellen in den einzelnen Vertiefungen der Chamber-Slides mit frischer Filipin-Lösung (0,05 mg/ml) überschichtet. Nach 30 minütiger Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit 1×PBS gewaschen, mit Einschlußmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen versehen.

Färbung in 96 well Platten:

Es wurde wie oben beschrieben vorgegangen, von allen Lösungen wurden je 50 µl pro well pipettiert. Nach der Inkubation mit Filipin wurden die Proben einmal mit 1×PBS gewaschen und anschließend mit 1×PBS überschichtet und im Fluorimeter die Fluoreszenz vermessen (Anregung 360 nm; Emission 460).

2.10.4 CHOLESTERINEXTRAKTION AUS VIRALEN MEMBRANEN

Für die Untersuchung des Einflusses des Cholesteringehaltes viraler Membranen auf die Stabilität der 4070A Retroviren wurde das Cholesterin mit Hilfe von Methyl-β-Cyclodextrin entfernt. Methyl-β-Cyclodextrin besteht aus 7 alpha-1,4-verknüpften Glukoseeinheiten und im Inneren dieser ringförmigen Moleküle können hydrophobe Gastmoleküle, wie z.B. Cholesterin, eingeschlossen werden.

Zu 10 ml virushaltigem Überstand (produziert in DME ohne FCS) wurde Methyl-β-Cyclodextrin (5 mM) gegeben und die Virussuspension für 5 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Viren für 2 Stunden und 4°C bei 30000 rpm in einem SW40Ti Rotor (Beckman) zentrifugiert und die pelletierten Viren in 200 µl DME ohne FCS aufgenommen.

Alternativ erfolgte die Aufkonzentrierung der Viren bei gleichzeitigem Austausch von FCS haltigem DME mit FCS freiem DME über Größenausschlußzentrifugation mit CentriPreps von Amicon. Die virushaltige Suspension wurde in fünffachem Volumen DME mit 5 mM Methyl-β-Cyclodextrin (MBCD) aufgenommen und 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Viren nochmals aufkonzentriert und das MBCD haltige DME gegen MBCD freies DME ausgetauscht.

Die so behandelten Viren wurden anschließend für Stabilitätsuntersuchungen (s. Abschnitt 2.9.6.4) eingesetzt.

2.10.5 CHOLESTERINEXTRAKTION AUS ZELLMEMBRANEN

nach Lu et al. [76]

Die Behandlung von eukaryotischen Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin wird neben der Cholesterinextraktion auch zur Auflösung der Rafts der Plasmamembran verwendet [76]. Durch die Infektion behandelter Zellen mit Viren kann die Abhängigkeit des Infektionsprozesses von der Existenz der Rafts untersucht werden.

NIH3T3-Zellen wurden in einer 6 Lochplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit DME ohne FCS 2 \times gewaschen und anschließend 30 min bei 37°C mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin in DME behandelt. Nach der erfolgten Inkubation wurden die Zellen 1 \times mit DME gewaschen und infiziert (Verdünnungen 1:10 und 1:100).

Der Prozentsatz der infizierten gfp-positiven Zellen wurde über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und FACS-Analyse (s. Abschnitt 2.9.6.9) bestimmt.

2.10.6 UNTERSUCHUNG DER RAFT-ASSOZIIERUNG VON PROTEINEN

nach Nguyen et al. [81]

Die Eigenschaft von Raft-assoziierten Proteinen in Triton X-100 unlöslich zu sein [116], eine Eigenschaft die durch die hohe Cholesterinkonzentration der Rafts vermittelt wird, bietet die Möglichkeit die Assoziation von Proteinen mit den Rafts zu untersuchen.

Dazu wurden adhärente Zellen in mittleren Flaschen kultiviert, abgelöst und $2,5 \times 10^7$ Zellen mit 180 \times g pelletiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml TKM-Puffer mit 1% Triton X-100 und Proteasehemmern (Sigma, Protease Inhibitor Cocktail) aufgenommen und mit einer 200 μ l Pipettenspitze resuspendiert.

Alternativ wurde für die Probenaufarbeitung die pelletierte Plasmamembran der Zellen verwendet. Dafür wurden die Zellen mit NE-Puffer abgelöst und bei 180 \times g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml 1 \times PBS gewaschen und anschließend bei 180 \times g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 8 ml eiskaltem hyperosmotischem Puffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Behandlung sollten die Zellen stark angeschwollen sein (mikroskopische Kontrolle). Die Zellen wurden erneut bei 180 \times g pelletiert und in 1 ml hyperosmotischem Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Ribolyser-

gefäße gegeben und bei 6500 upm für 20 Sekunden homogenisiert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 3 min bei 1000×g und 4°C zentrifugiert, um die Kernfraktion zu pelletieren. Der Überstand wurde nachfolgend bei 10000×g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend für die Untersuchung der Raft-Assoziation der Envelope-Proteine eingesetzt.

Die Proben (s. oben) wurden mit 1 ml 60%iger Saccharoselösung (in TKM-Puffer) versetzt und gut gemischt. 1,5 ml der Lösung wurden auf den Boden eines Zentrifugationsröhrchens pipettiert und mit je 1,5 ml 30%iger und 5%iger Saccharoselösung vorsichtig überschichtet. Der Ansatz wurde bei 4°C und 38000 upm in einem SW40Ti-Rotor von Beckman über Nacht zentrifugiert. Im Anschluß an die Zentrifugation wurden von oben 5 Fraktionen zu je 1 ml abgenommen.

Ein Aliquot der Fraktionen wurde 1:10 mit 1×PBS verdünnt und für Dot Blots (s. Abschnitt 2.8.3) eingesetzt. Von den Fraktionen wurde des weiteren der Protein- und Cholesteringehalt bestimmt (s. Abschnitte 2.8.4 und 2.10.1).

2.11 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

Für die Färbung von intrazellulären Zellbestandteilen wie z.B. Intermediärfilamenten und Proteinen des Cytoskelettes wurden am Vortag Zellen in Chamber-Slides ausgesät. Die Zellen wurden am folgenden Tag einmal mit Waschpuffer (1×PBS mit 0,5% BSA) gewaschen und bei –20°C mit Fixierungslösung (95% Ethanol, 5% Eisessig) für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Waschpuffer gewaschen und unspezifische Bindungen mit Blockierungslösung (1×PBS mit 10% BSA) abgesättigt. Es folgte eine 45 minütige Inkubation mit dem 1. Antikörper. Die Proben wurden dreimal mit Waschlösung gewaschen und anschließend mit dem 2. Antikörper überschichtet. Es schloß sich ein weiterer Waschschriff an. Die Proben wurden abschließend mit Einschlußmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt.

3 ERGEBNISSE

In den letzten Jahren wurden Retroviren bei der Mehrzahl der Gentherapien, die die klinische Phase erreichten, eingesetzt. Allerdings erschweren die geringen Titer und die virale Instabilität eine effiziente Produktion und führten zu einer Reihe von Bemühungen, die Titer durch verbesserte Verpackungszelllinien und optimierte Produktionsbedingungen zu erhöhen [23, 95, 96]. So wurden durch die Herabsenkung der Produktionstemperatur von 37°C auf 32°C höhere Virusaussbeuten erzielt. Untersuchungen zeigten, daß die Vitalität der Zellen dadurch nur wenig beeinträchtigt wird, aber die bis zu dreimal höhere Halbwertszeit der Retroviren bei 32°C zu einer stärkeren Akkumulation von Viren im Kulturmedium führt [26, 33]. Allerdings ist diese Methode zur Erhöhung der viralen Titer nicht unumstritten. Andere Autoren konnten diesen Effekt nicht bestätigen und empfehlen zum Teil die Produktion bei 37°C [32, 139]. Ein weiterer wesentlicher Punkt, der bisher in den vorliegenden Untersuchungen nicht berücksichtigt wurde, ist die mögliche Adaption der zellulären Plasmamembran an die geringere Kultivierungstemperatur. Es ist bekannt, daß Zellen auf die Absenkung der Umgebungstemperatur mit einer Veränderung der Lipidzusammensetzung ihrer Membran reagieren [140]. Möglicherweise zeigen Produktionszellen für retrovirale Vektoren ähnliche Effekte, was aufgrund der engen Assoziierung der Produktionszelle mit den gebildeten Retroviren zu Änderungen viraler Eigenschaften führen könnte. Die Kenntnis, inwieweit die viralen Stabilitätseigenschaften durch die Senkung der Kultivierungstemperatur von 37°C auf 32°C modifiziert werden, ist vorteilhaft, um die z.T. zeitaufwendigen Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsprozesse für eine hohe Ausbeute an infektiösen viralen Partikeln optimieren zu können.

Welchen Einfluß die Kultivierungstemperatur und die Produktionszelllinie auf die Bildung und Stabilität von amphotropen 4070A Retroviren hat, sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. Daneben wurden die wechselseitigen Interaktionen von Virus und Produktionszelle eingehender untersucht.

3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT DES AMPHOTROPEN 4070A MLV

3.1.1 BEEINFLUSSUNG DER PRODUKTION UND STABILITÄT VON 4070A MLV DURCH DIE PRODUKTIONSZELLINIE

Je nach Ursprungsorganismus der Zelllinie und dem Grad ihrer Differenzierung/Spezialisierung wird ein spezifisches Set an Genen exprimiert, wodurch sich z.B. die Zusammensetzung und Struktur der zellulären Plasmamembran (Lipidgehalt, Art der Lipide) und der in ihr enthaltenen Proteine ändert. Ein Beispiel dafür sind die Unterschiede im Glykosylierungspotential von murinen und humanen Zellen. Retroviren wie 4070A MLV's bilden aus der zellulären Plasmamembran die virale Hülle, wobei es nur zu einem minimalen Ausschluß zellulärer Proteine kommt [46]. Aufgrund dieser engen Koppelung des viralen Replikationszyklus an die Biologie der Wirts- bzw. Produktionszelle ist eine Beeinflussung der Produktion und der viralen Stabilitätseigenschaften durch die Wirtszelle möglich. Dies kann sich in Unterschieden in der Infektiösität und in der Resistenz der Viren gegenüber physikochemischen und biologischen Einwirkungen (thermische und mechanische Stabilität sowie Serumstabilität) widerspiegeln.

Zur Produktion von Retroviren für die Gentherapie werden zur Zeit vor allem Maus- oder humane Zelllinien verwendet [96-99]. Die Verwendung von murinen Verpackungszelllinien bietet den Vorteil, daß ein gut charakterisiertes System zum Einsatz kommt, hat aber den Nachteil, daß die Viren im Falle einer *in vivo* Therapie aufgrund der Glykanstruktur der Envelope-Proteine schnell in humanem Serum inaktiviert werden [88]. Humane Zelllinien und auch einige Hamsterzelllinien wie BHK synthetisieren diese Zuckerstrukturen nicht [21, 89], so daß die von ihnen gebildeten Retroviren serumstabiler sind [W. Hansen, GBF Braunschweig, Veröffentlichung in Vorbereitung, 96, 97, 142].

Hamsterzelllinien, wie BHK-A und BHK21B, sind für den Einsatz als Verpackungszelllinien nicht nur aufgrund der Produktion serumstabiler Viren interessant. Es handelt sich dabei um Zelllinien, die bereits seit mehreren Jahren bei verschiedensten biotechnologischen Prozessen

Zur Produktion von 4070A MLV's wurden neben den Hamsterzelllinien BHK-A und BHK-21B auch die humane TE 671 basierte Verpackungszelllinie TE FlyA7 und die murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3 eingesetzt. Für die Hamsterzelllinien BHK-A und BHK-21B standen zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente keine Verpackungszelllinien zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde für die Produktion der Retroviren ein Helfervirussystem generiert, bei dem die viralen Proteine von einem replikationskompetenten Wildtyp 4070A MLV exprimiert wurden und ein selektierbarer retroviraler Vektor koverpackt werden sollte.

Für die Generierung der helfervirusbasierten Produktionszelllinien wurden der retrovirale Vektor pLEIN (Clontech) und ein amphotroper 4070A Wildtyp-Provirus (O. Merten; Génom) in die verschiedenen Zelllinien kotransfiziert (siehe Abbildung 3.1). Das 4070A MLV-Plasmid enthält ein komplettes MLV-A Provirus, und seine Transfektion führt zur Generierung replikationskompetenter 4070A Retroviren. Bei einem Kotransfer mit dem retroviralen Vektor pLEIN in die jeweiligen Zelllinien sollte es bei der Bildung der viralen Partikel zur Koverpackung der RNA des retroviralen Vektors und des 4070A MLV kommen. Da RNA's unterschiedlicher Länge mit verschiedener Effizienz in die viralen Partikel verpackt werden könnten, das replikationskompetente MLV aber nicht über Selektions- und Detektionsmarker nachweisbar ist, wurde die Effizienz der Koverpackung in einem ähnlichen Helfervirussystem untersucht. Für diese Untersuchungen wurde das Plasmid pMLVDHFR*-5 [134] verwendet, das für das ecotrope Moloney MLV kodiert und durch Selektion der infizierten Zellen mit Methotrexat nachgewiesen werden kann. Eine Verpackung des retroviralen Vektors pLEIN in die viralen Partikel kann durch die bei Infektion vermittelte Neomycinresistenz und egfp-Expression belegt werden.

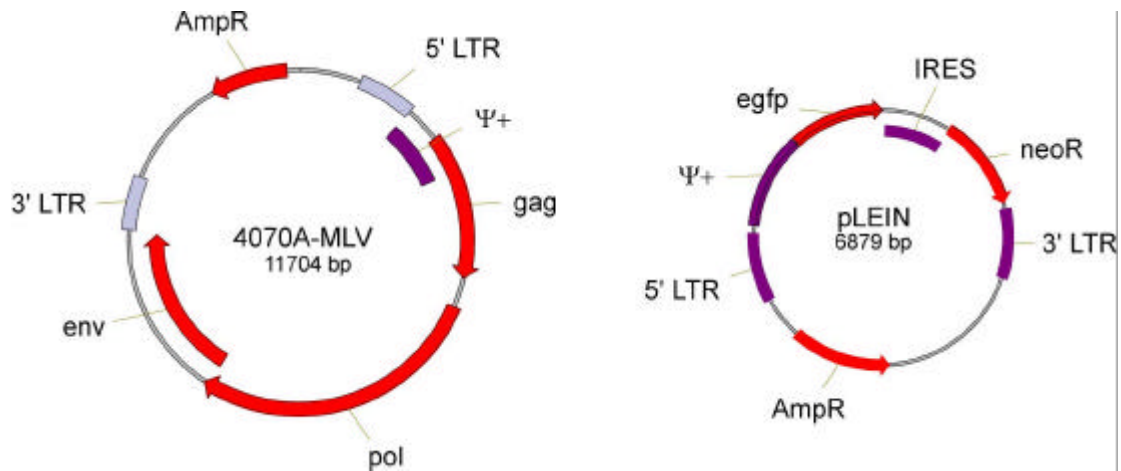


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des 4070A MLV Provirus-Plasmids und des retroviralen Vektors pLEIN. (AmpR – Ampicilin Resistenzgen; neoR- Neomycin Resistenzgen; egfp – enhanced green fluorescence protein; IRES- internal ribosomal entry site; LTR – long terminal repeat; Ψ+ - erweitertes Verpackungssignal; gag, pol, env – 4070A MLV Gene)

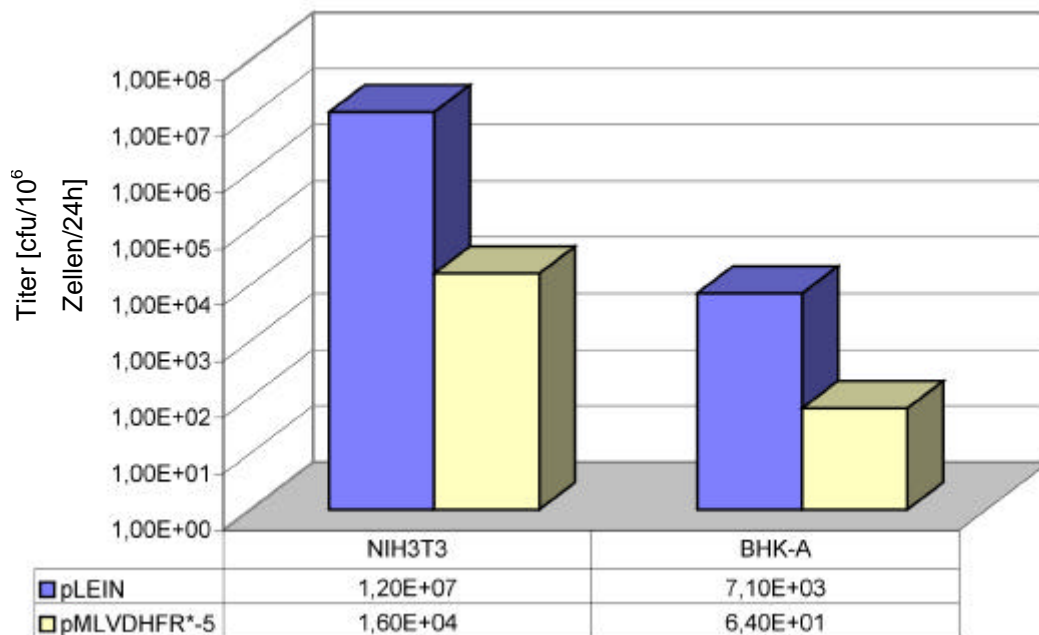


Abb.3.2: Effizienz der Koverpackung des retroviralen Vektor pLEIN und des ecotropen Moloney MLV pMLVDHFR*-5. NIH3T3 und BHK-A wurden mit pLEIN und pMLVDHFR*-5 kotransfiziert und stabile Klone mit G418 selektiert. Der Anteil pLEIN-haltiger Viren wurde durch G418-Selektion, pMLVDHFR*-5-haltiger Viren durch MTX-Selektion durch Endpunkttiter auf NIH3T3 bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte einer Infektion in Doppelbestimmung.

NIH3T3- und BHK-A-Zellen wurden stabil mit dem pLEIN und dem pMLVDHFR*-5 Vektor transfiziert und der Einbau in virale Partikel durch Endpunktselektionstiter auf NIH3T3-Zellen überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß die Verpackung des retroviralen Vektors gegenüber dem Provirus anscheinend bevorzugt ist. Bei der Produktion der Viren durch NIH3T3 wird pLEIN 750× und bei BHK-A 144× häufiger verpackt als der Helfervirus pMLVDHFR*-5 (siehe Abb.3.2). Aufgrund des deutlich geringeren Anteils des Helfervirus an der Gesamtmenge der infektiösen Viren wurden die Titerbestimmungen für die Stabilitätsuntersuchungen ausschließlich über die G418-Selektion des retroviralen pLEIN-Vektors durchgeführt.

3.1.1.2 Einfluß der Zelllinie auf die Produktion von 4070A MLV

Nach der Etablierung der Helfervirussysteme für NIH3T3, BHK-A und BHK21B, sollte der Einfluß der Zelllinie auf die Produktion infektiöser 4070A MLV's überprüft werden. Dazu wurden die Retroviren, wie in Abschnitt 2.9.6.1 beschrieben, in NIH3T3, BHK-A, BHK21B und TE FlyA7 produziert und die Bildung infektiöser 4070A MLV überprüft. Von den vier Zelllinien produzierten die murine und die humane Produktionszelllinie die höchsten Titer (siehe Tabelle 3.1). Die Produktion infektiöser 4070A Retroviren war bei den Zelllinien BHK-A und BHK21B deutlich geringer als bei NIH3T3 (10500 fach bzw. 32000 fach reduziert). Die Titer des murinen Helfervirussystems waren im Vergleich zur humanen Verpackungszelllinie TE FlyA7 circa 150 fach höher.

Ein Grund für die drastisch geringeren Titer von BHK-A und BHK21B könnte eine niedrigere Bildungsrate für 4070A MLV's sein. Zur Abschätzung der Produktivität von Zelllinien wird u.a. die Quantifizierung von strong-stop cDNA enthaltenden viralen Partikel eingesetzt [84]. Für diese Analysen wird die Eigenschaft der viralen reversen Transkriptase ausgenutzt, bereits vor der Infektion einer Wirtszelle einen Teil der viralen RNA in cDNA umzuschreiben [90], welche dann mit Hilfe geeigneter Primer in der Realtime-PCR quantifiziert wird. Diese Methode wurde an den Lightcycler adaptiert [K. Müller et al., GBF Braunschweig, unveröffentlicht] und die Produktivität von NIH3T3, BHK-A, BHK21B und TE FlyA7 untersucht.

Aus den Daten der Tabelle 3.1 wird ersichtlich, daß die Anzahl der cDNA-Partikel einen wesentlich höheren Titer bei BHK-A und BHK21B zulassen würde. Beide Zelllinien entlassen nur 8,6 bzw. 5,2 mal weniger cDNA-haltige virale Partikel als NIH3T3. TE FlyA7 bildet bei einem höheren Titer als BHK-A und BHK21B dagegen sogar circa 38 mal weniger cDNA-Partikel als NIH3T3. Es wird deutlich, daß die Zelllinie selbst einen entscheidenden Einfluß auf den Anteil von infektiösen 4070A MLV's an der cDNA-Partikelzahl der produzierten Viren ausübt. Dieser nimmt demnach in der folgenden Reihenfolge ab: NIH3T3 > TE FlyA7 > BHK-A > BHK21B. Während bei NIH3T3 mehr infektiöse 4070A MLV's als cDNA-Partikel nachzuweisen sind, sind circa die Hälfte der Partikel bei TE FlyA7 infektiös. Bei BHK-A und BHK21B beträgt der Anteil der infektiösen Viren an der cDNA-Gesamtpartikelzahl allerdings nur 0,17% bzw. 0,04%.

Tabelle 3.1: Einfluß der verschiedenen Produktionszelllinien auf die Produktion von 4070A MLV. Die Titer wurden für NIH3T3, BHK-A und BHK21B durch Infektion von NIH3T3 nach der Endpunktmethode über G418-Selektion infizierter Zellen bestimmt. Die Bestimmung der Titer von TE FlyA7 erfolgte durch Infektion von HT1080 Zellen. Infizierte Zellen wurden nach der Endpunktmethode durch β -Gal-Färbung quantifiziert. Die Bestimmung der physischen Partikel erfolgte über die Quantifizierung der strong-stop cDNA im Zellkulturüberstand. Die Angaben sind Durchschnittswerte von vier unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung, für TE FlyA7 zwei unabhängige Messungen.

Zelllinie	Titer [cfu/10 ⁶ Zellen/24h]	cDNA-Partikel [Partikel/10 ⁶ Zellen/24h]	Anteil der infektiösen Viren an der cDNA-Partikelzahl
NIH3T3	6,7×10 ⁷	3,1×10 ⁷	216 %
BHK-A	6,3×10 ³	3,7×10 ⁶	0,17 %
BHK21B	2,1×10 ³	6,0×10 ⁶	0,04 %
TE FlyA7	4,6×10 ⁵	8,2×10 ⁵	56,1 %

Es wird weiterhin deutlich, daß zwischen dem Titer und dem cDNA-Partikelzahl bei NIH3T3 eine nicht plausible Diskrepanz besteht. Offensichtlich ist ein mit dieser Methode nicht zu bestimmender zelltypspezifischer Faktor notwendig, der den Anteil der cDNA an der Gesamtpartikelzahl und den infektiösen Viren berücksichtigt. Die Bestimmung solcher Faktoren ist jedoch an die Kenntnis der tatsächlich vorhandenen viralen Partikel geknüpft. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode zur Quantifizierung physischer viraler Gesamtpartikel entwickelt.

3.1.1.2.1 Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung retroviraler Partikel

Für die Quantifizierung von Retroviren sind eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden entwickelt worden. Sie lassen sich nach ihrem Prinzip in zwei Arten klassifizieren. Zum einen handelt es sich um indirekte Quantifizierungsmethoden, bei denen von viralen Enzymaktivitäten oder dem Nukleinsäuregehalt auf die Anzahl der viralen Partikel geschlossen wird. Zum anderen sind es direkte Methoden, die der Sichtbarmachung der viralen Partikel dienen. Zur ersten Klasse zählen der Nachweis der viralen RNA, der viralen strong-stop cDNA und der Aktivität der viralen reversen Transkriptase [84, 85, 143, 144]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen und immunhistochemische Färbungen der viralen Envelope-Proteine auf der Virusoberfläche zählen zur zweiten Klasse der verwendeten Methoden [103, 7]. Die Vorteile der indirekten Methoden liegen in ihrer relativ einfachen Durchführung und in der schnellen Quantifizierung einer großen Probenzahl. Der Nachteil dieser Art der Partikelzahlbestimmung liegt darin, daß sie nur einen ungefähren Anhaltspunkt für die Anzahl der freigesetzten Viren bietet und, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, zum Teil zelltypspezifische Faktoren zur Berechnung der Gesamtpartikelzahlen notwendig sind. Die direkten Methoden haben diesen Nachteil nicht, aber elektronenmikroskopische Untersuchungen weisen einen nicht unerheblichen Geräte- und Materialaufwand auf. Die von Pizzato et al. [7] entwickelte immunhistochemische Färbung von MLV ist dagegen weniger aufwendig und die viralen Partikel können mit einem Fluoreszenzmikroskop quantifiziert werden. Allerdings kann diese Methode nur angewandt werden, wenn die entsprechenden Antikörper gegen die viralen Envelope-Proteine erhältlich sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Virusquantifizierung kombiniert die Vorteile einer antikörperunabhängigen Färbung der viralen Membran und die Quantifizierung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes.

Bei der Bildung und der Freisetzung der Retroviren wird die virale Membran aus der Plasmamembran der Produktionszelle gebildet. Diese Umhüllung des Virus gleicht in der Zusammensetzung den Membranbereichen, in denen die Ausknospung des Virus stattgefunden hat [46]. Bestandteil ist neben Proteinen, Sphingo- und Glykolipiden auch Cholesterin. Dieses Lipid ist ein essentieller Bestandteil eukaryotischer Zellen, an das spezifisch Filipin bindet. Filipin wurde aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces filipinensis* isoliert, besteht aus einem 35 gliedrigen Lacton-Ring und gehört damit zur Gruppe der Polyen-Antibiotika [145]. In

früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Filipin mit dem Cholesterin der äußeren Hülle von Retroviren und anderen umhüllten Viren einen Komplex bildet [146, 147]. Die Membranen der Viren dienten dabei zur Untersuchung von Protein-Lipid Interaktionen. Für eine Quantifizierung viraler Partikel sind diese Interaktionen zwischen Cholesterin und Filipin bisher jedoch nicht verwendet worden.

Für die Quantifizierung der viralen Partikel wurden die fluorogenen Eigenschaften von Filipin ausgenutzt. Filipin markierte Viren können im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (Anregung 387 nm, Emission 450 nm) und quantifiziert werden (siehe Abbildung 3.3). Ein Vorteil dieser Partikelfärbung ist der generelle Einsatz bei allen Virusarten, die über eine Umhüllung mit Teilen der zellulären Plasmamembran verfügen. Desweiteren verringert die Spezifität des Filipins für Cholesterin eine aufwendige Optimierung, wie sie häufig bei immunhistochemischen Färbungen notwendig ist. Die Quantifizierung der physischen viralen Partikel erfolgt über den direkten Vergleich mit Texas Rot markierten Beads, die dem virus-haltigen Überstand vor der Fixierung in bekannter Konzentration zugesetzt wurden.

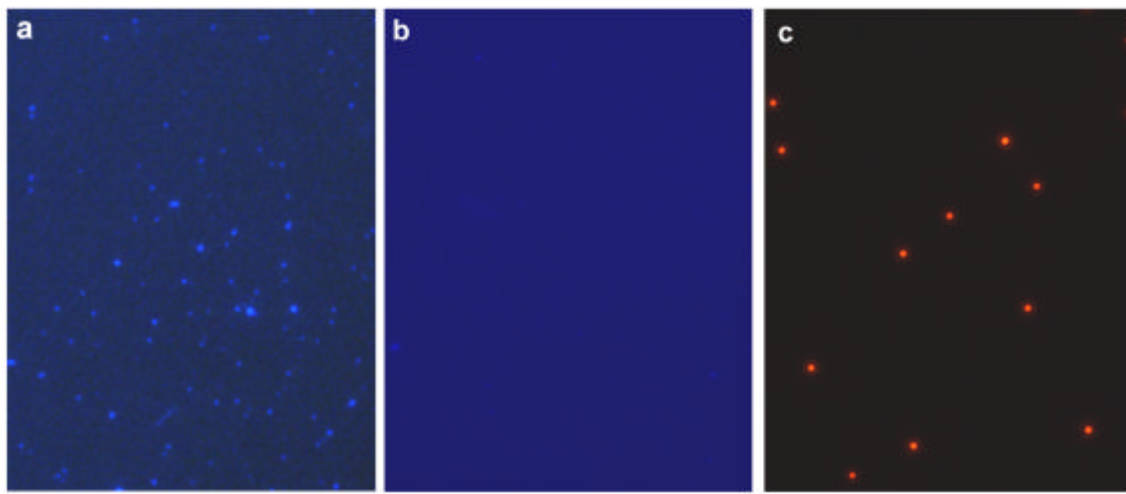


Abb.3.3: Markierung der viralen Membran von 4070A MLV's mit Filipin. a) 4070A MLV produziert von NIH3T3 nach Transfektion mit dem 4070A MLV Provirus und dem retroviralen Vektor pLEIN. Die Viren wurden nach der Fixierung auf Glasobjektträgern durch Polybrene mit Filipin markiert; b) Negativkontrolle; Überstand von mock transfizierten NIH3T3; c) Texas Rot markierte 100 nm große Beads. Die Beads wurden ebenfalls mit Polybrene auf Glasobjektträger fixiert und dienen als Größenvergleich mit den circa 100 nm großen viralen Partikeln und als Standard für die Quantifizierung; fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Originalvergrößerung 1000× (Ölimmersionsobjektiv)

Für den Einsatz dieser Methode zur Quantifizierung physischer viraler Partikel muß die Reproduzierbarkeit der Analysen gewährleistet sein. Dazu wurden neun virale Proben in Doppelbestimmung gefärbt und jede einzelne Färbung quantifiziert. Aus den Daten wurde die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert berechnet. Diese lag bei 12,5% und war für den Einsatz der Färbung als Quantifizierungsmethode akzeptabel. Diese Methode ist zudem 7 bis 40× sensitiver als die Bestimmung der Anzahl von physischen viralen Partikeln über die strong-stop cDNA (vergleiche Tabelle 3.1 und 3.2).

Tabelle 3.2: Einfluß der verschiedenen Zelllinien auf die Produktion von 4070A MLV. Die Titer wurden für NIH3T3, BHK-A und BHK21B auf NIH3T3 nach der Endpunktmethode über G418-Selektion infizierter Zellen bestimmt. Die Bestimmung der Titer von TE FlyA7 erfolgte durch Infektion von HT1080 Zellen. Infizierte Zellen wurden nach der Endpunktmethode durch β -Gal-Färbung quantifiziert. Die Bestimmung der Anzahl der physischen Partikel erfolgte über die Quantifizierung filipinegefärbter viraler Partikel aus dem Zellkulturüberstand (Abweichung 12,5%). Die Angaben sind Durchschnittswerte von zwei unabhängigen Färbungen mit parallel durchgeführter Titerbestimmung.

Zelllinie	Titer [cfu/10 ⁶ Zellen/24h]	physische Partikel [Partikel/10 ⁶ Zellen/24h]	Anteil der infektiösen Viren an der Gesamtpartikelzahl
NIH3T3	1,3×10 ⁶	1,5×10 ⁸	0,9 %
BHK-A	8,8×10 ³	5,8×10 ⁷	0,015 %
BHK 21B	1,2×10 ³	2,6×10 ⁷	0,005 %
TE FlyA7	4,6×10 ⁵	3,2×10 ⁷	1,4 %

Die Quantifizierung von 4070A MLV's über strong-stop cDNA und die Färbung mit Filipin unterscheiden sich zwar in ihren Absolutwerten, aber weisen eine ähnliche Tendenz der Ergebnisse auf. NIH3T3 und TE FlyA7 entlassen gegenüber den beiden Hamsterzelllinien einen deutlich höheren Anteil infektiöser 4070A MLV's. Durch die Bestimmung der viralen Gesamtpartikel mit Hilfe der Filipinfärbung wird besonders deutlich, daß die Qualität der Bildung von retroviralen 4070A Partikeln entscheidend von der verwendeten Produktionszelllinie abhängig ist. Während bei NIH3T3 und TE FlyA7 circa 1% der Partikel infektiös ist, so ist lediglich einer von über 20000 Partikeln bei BHK21B in der Lage, eine Wirtszelle zu infizieren. Ein Grund hierfür könnte in einer niedrigeren Aktivität der viralen reversen Transkriptase liegen. Eine Möglichkeit Rückschlüsse auf die RT-Aktivität der retroviralen Partikel zu ziehen, ist der Vergleich des Gehaltes an strong-stop cDNA, die durch die Aktivität der reversen

Transkriptase gebildet wird. Aus den Daten der Tabellen 3.1 und 3.2 wurde die Anzahl der cDNA-Partikel pro physischem viralem Partikel ermittelt. Aus den Berechnungen wurde deutlich, daß die 4070A MLV's (BHK21B) den gleichen und die 4070A MLV's (BHK-A) einen nur viermal geringeren cDNA-Gehalt als die NIH3T3 produzierten Viren aufwiesen. Somit konnte eine geringere RT-Aktivität als Ursache für die große Anzahl nicht-infektiöser viraler Partikel ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit dafür ist eine unzureichende Präsentation von Envelope-Proteinen auf den viralen Partikeln, wodurch die Bindung des Virus an den Rezeptor und die anschließende Internalisierung verhindert würde.

3.1.1.2.2 Nachweis des Envelope-Proteins auf der Oberfläche von 4070A MLV

Es ist bekannt, daß auch in der Abwesenheit verschiedener viraler Komponenten die Bildung und Freisetzung sogenannter virusähnlicher Partikel erfolgt [91, 92]. Diese Partikel sind aufgrund der fehlenden, aber für den Infektions- bzw. Replikationsprozeß notwendigen, viralen Komponenten nicht infektiös. Eines der Proteine, dessen Fehlen den Zusammenbau und die Freisetzung von viralen Partikeln nicht behindern [92], aber für den Infektionsprozeß entscheidend ist, ist das Envelope-Protein. Um eine mangelnde Expression des Envelope-Gens und Bildung des Envelope-Proteins als Grund für die hohe Zahl nicht-infektiöser 4070A Partikel bei den BHK-Zelllinien auszuschließen, wurde die Envelope-Präsentation auf den von NIH3T3 und BHK-A gebildeten 4070A MLV's untersucht. Dazu wurden Western Blots, Dot Blots und immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

Sowohl bei den von NIH3T3 als auch bei den von BHK-A produzierten 4070A MLV's konnten im Western Blot die viralen Envelope-Proteine nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.5). In beiden Fällen befand sich die zugehörige Bande auf Höhe der für das Envelope-Protein erwarteten 70 kD Bande. Nachdem damit auch die Spezifität der Detektion der Envelope-Proteine gezeigt wurde, erfolgte die Quantifizierung der Envelope-Proteine mit einem Dot Blot. Dazu wurde die Intensität der Dots und die Anzahl der viralen physischen Partikel mittels Filipinfärbung ermittelt. Die Intensität, die einem viralen 4070A Partikel entspricht, ist bei Viren, die von NIH3T3 gebildet wurden, lediglich doppelt so hoch, wie bei BHK-A produzierten Partikeln (siehe Abbildung 3.6). Damit sollten genügend viele Envelope-Proteine, die keine im Western Blot nachweisbare Veränderung zeigen, auf den Viren präsent sein.

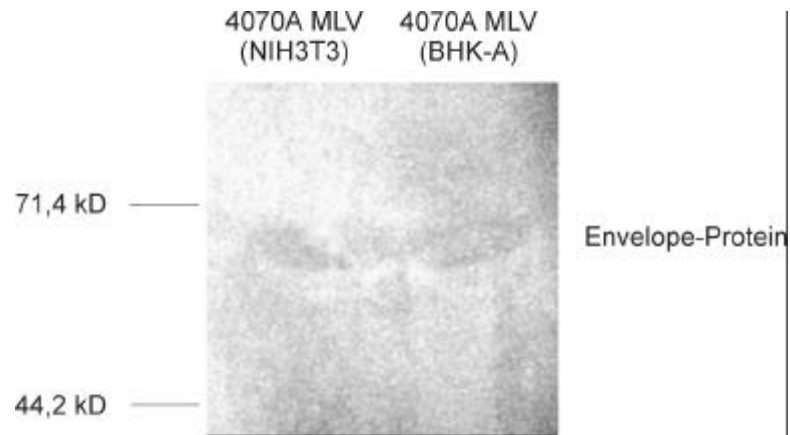


Abb.3.5: Western-Blot der Envelope-Proteine von NIH3T3 und BHK-A produzierten 4070A MLV. Je 5 ml 4070A MLV haltiger Überstand von NIH3T3 und BHK-A wurden in der Ultrazentrifuge bei 30000 upm im SW40Ti Rotor pelletiert und in 200 µl 1×PBS aufgenommen. Ein Aliquot davon wurde in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Envelope-Proteine im Western Blot nachgewiesen.

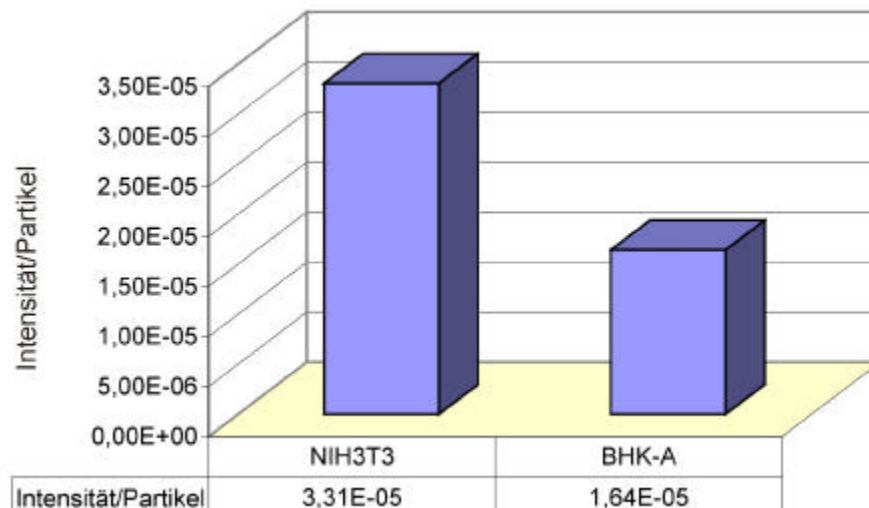


Abb. 3.6: Vergleich der Envelope-Präsentation auf 4070A MLV produziert von NIH3T3 und BHK-A. Virushaltiger Überstand von NIH3T3 und BHK-A wurde mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert und die Envelope-Konzentration auf den Viren über die Intensität der Dot Blots ermittelt. Ein Teil der Proben diente zur parallelen Quantifizierung der viralen Gesamtpartikel durch Filipinfärbung. Die Intensität der Dots wurde auf einen viralen Partikel umgerechnet.

Zusätzlich zur Quantifizierung der Envelope-Moleküle wurde überprüft, ob die 4070A MLV's in der Lage sind, an NIH3T3, wie sie auch zur Titerbestimmung eingesetzt werden, zu binden. Dazu wurde der nach Pizzato et al. [7] adaptierte Bindungsassay verwendet. Durch diese Untersuchung konnte nachgewiesen werden, daß die von BHK-A gebildeten Viren an NIH3T3 binden können. Eine Quantifizierung der gebundenen Viren war nicht möglich.

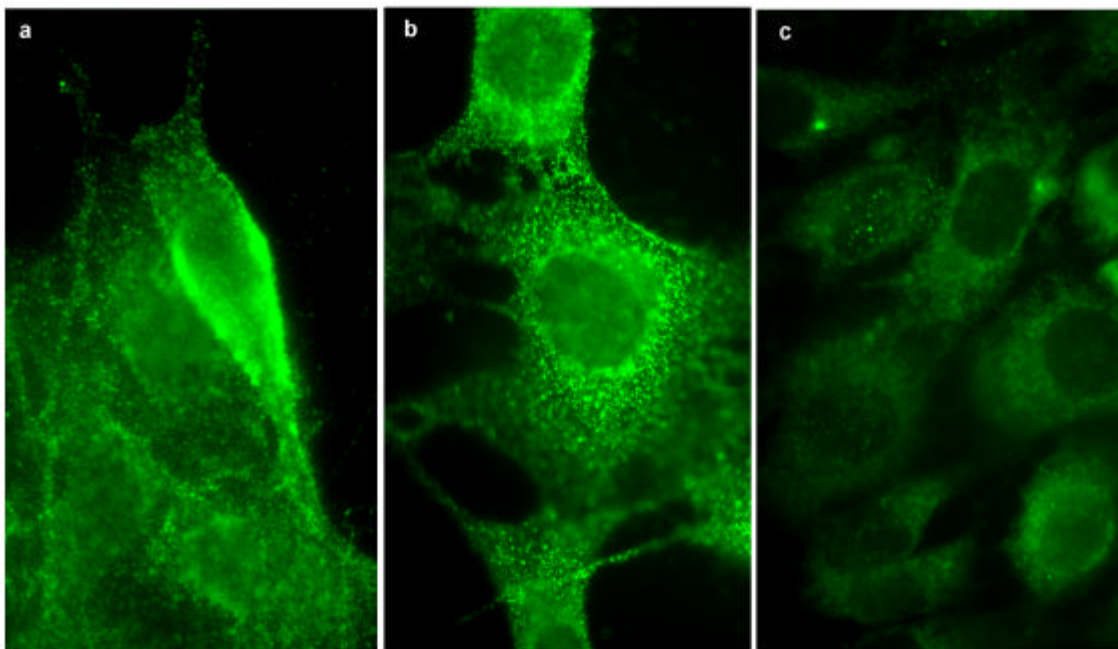


Abb.3.7: Immunhistochemische Färbung des Envelope-Proteins auf 4070A MLV's nach Bindung an NIH3T3. a) Bindung von NIH3T3 produzierten 4070A MLV; b) Bindung von BHK-A produzierten 4070A MLV; c) Negativkontrolle (Überstand mock-transfizierter NIH3T3); Die von NIH3T3 und BHK-A produzierten 4070A MLV's, wurden nach der Bindung an NIH3T3 fixiert und nach der modifizierten Methode von Pizzato et al.[7] angefärbt. (anti-Envelope Antikörper 83A25 von Evans et al. [86]); fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Originalvergrößerung 1000× (Ölimmersionsobjektiv)

Die untersuchten Charakteristika der nicht-infektiösen viralen Partikel, die von BHK-A und BHK21B gebildet werden, unterscheiden sich nur unwesentlich von den NIH3T3 produzierten 4070A MLV's. Sie verfügen über virale RNA (nachgewiesen über die strong-stop cDNA), haben eine ausreichende Menge an reverser Transkriptase und besitzen Envelope-Proteine, die in der Lage sind, die Bindung an NIH3T3-Zellen zu vermitteln. Warum die Viren trotzdem in einem so hohen Maße nicht infektiös sind, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären.

Nachdem gezeigt wurde, daß die verwendeten Zelllinien einen entscheidenden Einfluß auf die Produktion infektiöser 4070A MLV's haben, sollte ihre Bedeutung für die physikochemischen Stabilitätseigenschaften der Viren untersucht werden.

3.1.1.3 Untersuchungen des Einflusses der Produktionszelllinie auf die physikochemische Stabilität von 4070A MLV

Es wurde vermutet, daß die Zelllinie nicht nur einen Einfluß auf den viralen Titer, sondern auch auf die Stabilitätseigenschaften der 4070A MLV's hat. Für die Untersuchungen wurden von NIH3T3, BHK-A, BHK21B und TE FlyA7 über einen Zeitraum von 24 Stunden die Viren bei 37°C produziert und anschließend bei 4°C und Raumtemperatur (20°C) gelagert. Nach entsprechenden Zeiträumen wurde von einem Teil der virushaltigen Überstände der Titer bestimmt, um die Halbwertszeit und die Kinetiken der Inaktivierung während der Lagerung der Viren bestimmen zu können.

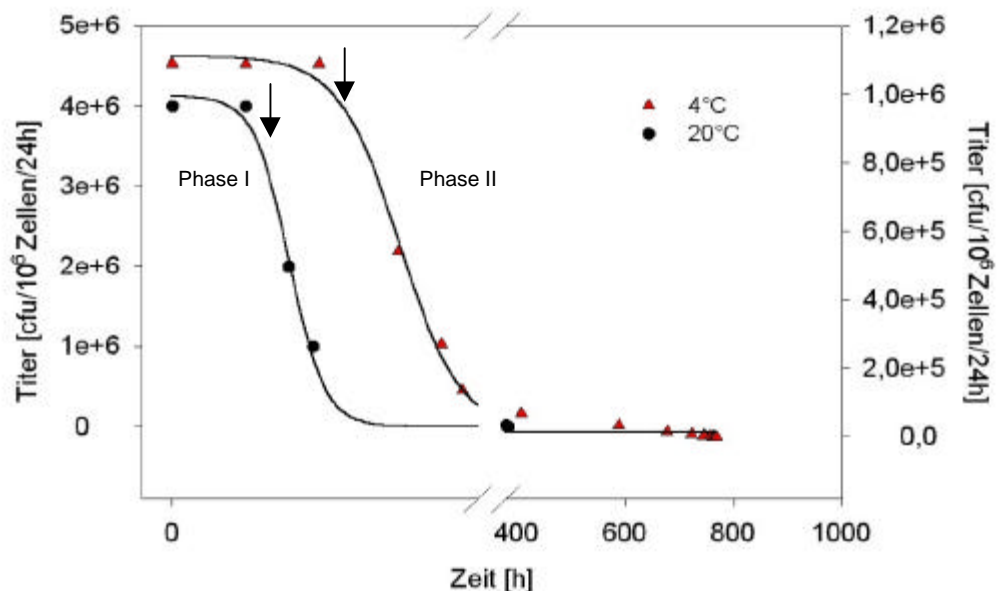


Abb. 3.8: Kinetiken der Virusinaktivierung bei 4°C und 20°C. 4070A MLV haltiger Überstand, produziert von NIH3T3, wurde filtriert (0,45 µm) und bei 4°C und 20°C gelagert. Nach 0, 24, 48, 96, 192, 384 und 768 Stunden wurde mit einem Aliquot der Viren eine Titerbestimmung auf NIH3T3 durchgeführt. Zur Berechnung der Datenpunkte für die Kinetik wurde in erster Näherung ein linearer Abfall des Titors zwischen den einzelnen Meßpunkten angenommen. In die sich daraus ergebenden Geradengleichungen wurden die Titer, die ausgehend vom Ausgangstiter jeweils im Wert halbiert wurden, eingesetzt und somit die zugehörigen Punkte berechnet. Der Beginn der Phase II der Inaktivierungskinetik (siehe Text) ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Kinetiken der Inaktivierung der 4070A MLV's bei 4°C und Raumtemperatur (20°C) sind in Abbildung 3.8 beispielhaft für NIH3T3 produzierte Viren gezeigt. Für die von BHK-A, BHK21B und TE FlyA7 gebildeten Retroviren verlief die Abnahme der Infektiösität ähnlich, lediglich die Geschwindigkeit der Abnahme der Infektiösität änderte sich. Die ermittelten Inaktivierungskinetiken lassen sich in zwei Phasen einteilen: Eine langsame Inaktivierungsgeschwindigkeit in Phase I (Plateauphase) und eine deutlich schnellere exponentielle Abnahme der Infektiösität der 4070A MLV's in Phase II. Dies wird aus der Kinetik, die sich aus der Lagerung bei 4°C ergibt und einen ausgeprägten sigmoidalen Verlauf hat, besonders deutlich. Die Plateauphase dauert bei einer Lagerung bei 4°C mehrere Tage. Im dargestellten Beispiel erstreckte sie sich für NIH3T3 produzierte Viren über 2 Tage. Erst nach diesem Zeitraum begann die meßbare Verringerung der Infektiösität der Viren. Bei der Lagerung bei 20°C ist diese Phase weniger stark ausgeprägt im Vergleich zur Lagerung bei 4°C.

Aus den Inaktivierungskinetiken ließen sich mit Hilfe mathematischer Regressionen Formeln ermitteln (siehe Formeln 1 und 2), mit denen die in Abbildung 3.9 dargestellten Halbwertszeiten der produzierten Viren berechnet werden konnten. Bei einer Plateauphase von weniger als 24 Stunden und/oder einem exponentiellen Gesamtverlauf der Inaktivierungskinetik wurde Formel (1), bei einem sigmoidalem Verlauf und einer mehr als 24 stündigen Phase I Formel (2) zur Berechnung der Halbwertszeiten herangezogen.

$$(1) \quad HWZ_{\text{exp}} = \frac{\ln \frac{y_0}{2} - \ln a}{-b} \qquad (2) \quad HWZ_{\text{sig}} = -\ln \left(\frac{a}{\left[\frac{y_0}{2} \right]} - 1 \right) \times b + x_0$$

HWZ – Halbwertszeit [h]
 y_0 - Ausgangstiter [cfu/10⁶ Zellen/24h]
 x - Zeit [h]
 a, b, x_0 - Gleichungsparameter

Die errechneten Halbwertszeiten sind in Abbildung 3.9 grafisch dargestellt.

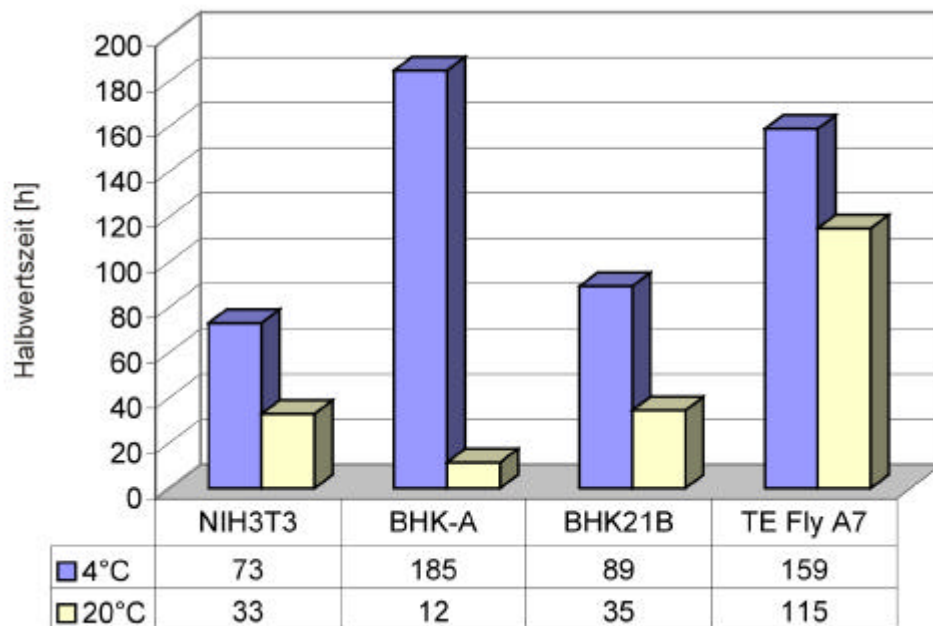


Abb. 3.9: Halbwertszeiten der 4070A MLV's bei 4°C und 20°C (Raumtemperatur). Der 4070A MLV haltige Überstand nach 24 Stunden Produktion von NIH3T3, BHK-A, BHK21B und TE FlyA7 wurden filtriert (0,45 µm) und bei 4°C bzw. 20°C gelagert. Nach 0, 24, 48, 96, 192, 384 und 768 Stunden wurde mit einem Aliquot der Viren eine Titerbestimmung auf NIH3T3 oder HT1080 (TE FlyA7-Überstand) durchgeführt. Die Formeln (1) bzw. (2) dienten dazu, aus den ermittelten Inaktivierungskinetiken die Halbwertszeiten zu berechnen. Die Werte wurden aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung ermittelt, Fehler: 4°C bei BHK-Zelllinien circa 58%, sonst 3%; 20°C durchschnittlich 9%)

Aus Abbildung 3.9 wird deutlich, daß die Halbwertszeiten der 4070A MLV's von der Lagerungstemperatur abhängig sind. Erwartungsgemäß werden die gebildeten Viren bei Raumtemperatur schneller inaktiviert als bei 4°C.

Die Art der Produktionszelllinie hat ebenfalls einen entscheidenden Einfluß auf die Stabilität der 4070A MLV's. Aber welche Zelllinie die stabilsten Viren produziert, ist auch abhängig von der Temperatur, bei der die Lagerung durchgeführt wurde. So besitzen die von BHK-A gebildeten Viren bei 4°C, die von TE FlyA7 bei 20°C die höchsten Halbwertszeiten. Durch Kombination der 4°C und 20°C Werte lassen sich die Produktionszelllinien nach der Stabilität der entlassenen Viren wie folgt ordnen: TE FlyA7 > BHK-A/BHK21B > NIH3T3.

3.1.1.4 Bestimmung der Proteaseaktivität 4070A MLV haltiger Zellkulturüberstände

Um auszuschließen, daß die Unterschiede in der Inaktivierungsrate der 4070A MLV's durch die Aktivität sekretierter Proteasen verursacht wird, wurde die Proteaseaktivität der jeweiligen Zellkulturüberstände durch einen Enzymtest bestimmt (siehe Abbildung 3.10).

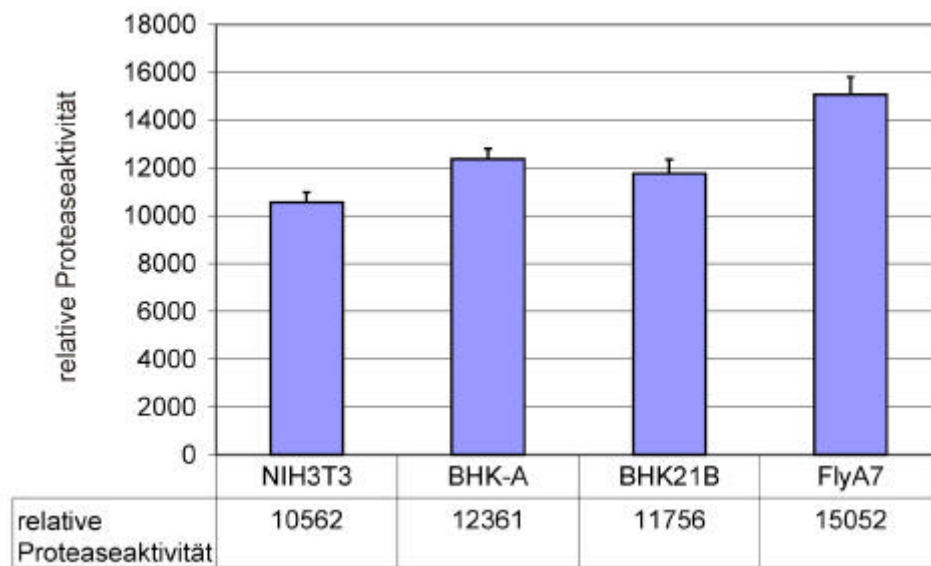


Abb. 3.10: Proteaseaktivität im Überstand von 4070A MLV produzierenden Zellen. 4070A MLV haltige Überstände von NIH3T3, BHK-A, BHK21B und TE FlyA7 wurden nach 24 Stunden Produktion bei 37°C filtriert (0,45 µm) und auf ihre Proteaseaktivität mit dem EnzChek™ Protease Assay (Molecular Probes) getestet. Da kein Protease-Standard verwendet werden konnte, sind die Relativwerte der Messungen nach Abzug des Hintergrundes gezeigt (zwei unabhängige Messungen in Achtfachbestimmung). Die Aktivität der Protease wird durch die Fluoreszenzstärke angezeigt, die nach der Spaltung eines fluoreszenzmarkierten Proteins erzeugt wird.

Die Proteaseaktivität im 4070A haltigen Überstand wird durch die Ergebnisse des Testes als Ursache für die unterschiedlich schnelle Inaktivierung der Retroviren weitgehend ausgeschlossen. Die höchste Proteaseaktivität weisen TE FlyA7 Überstände auf. Diese produzieren aber auch die stabilsten Viren, während NIH3T3 bei gleichzeitiger Produktion der instabilsten Viren die geringste Menge an Proteasen sekretiert.

3.1.2 EINFLUß DER PRODUKTIONSTEMPERATUR AUF DIE PRODUKTION UND STABILITÄT VON 4070A MLV

Nachdem gezeigt wurde, daß die Produktionszelllinie einen entscheidenden Einfluß auf die Produktion infektiöser 4070A MLV's und ihre Stabilitätseigenschaften hat, sollte die Bedeutung der Kultivierungstemperatur für die virale Produktion und Stabilität geklärt werden.

Wie erwähnt, wird von verschiedenen Autoren für die Produktion von rekombinanten Retroviren die Kultivierung der Verpackungszellen bei 32°C empfohlen [26, 33]. Die höhere Halbwertszeit der gebildeten Partikel bei 32°C im Gegensatz zu 37°C führt bei nahezu gleichbleibender Produktivität zur vermehrten Virusakkumulation im Zellkulturüberstand. Der Einfluß, den die veränderten Kultivierungsbedingungen auf zelluläre Prozesse, die Zusammensetzung der Plasmamembran und damit möglicherweise auf die Eigenschaften von 4070A MLV's hat, wurde bisher nicht untersucht.

3.1.2.1 Einfluß auf die Produktion von 4070A MLV

Um zu klären, welche Bedeutung die Temperatur für die Bildung infektiöser 4070A MLV's und viraler Gesamtpartikel hat, erfolgten vergleichende Untersuchungen bei den Kultivierungstemperaturen 32°C und 37°C. Eine 24 stündige Produktion der 4070A MLV's bei 32°C reduziert die Höhe der Titer bei allen untersuchten Zelllinien (siehe Tabelle 3.3). Dabei ist der Unterschied in der Ausbeute an infektiösen Viren von 4070A MLV's bei NIH3T3 am stärksten (circa 11fache Reduktion) und bei TE FlyA7 am geringsten ausgeprägt. Diese Daten weichen von den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ab [26, 33]. Da es sich dort aber um Langzeitproduktionen der retroviralen Vektoren handelte, wäre es möglich, daß eine Produktionszeit von 24 Stunden für eine effektive Virusakkumulation im Zellkulturüberstand nicht ausreicht.

Ähnlich wie bei der Produktion bei 37°C lagen die Titer der beiden BHK-Zelllinien weit unter denen von NIH3T3 und TE FlyA7 (circa 200 bis 7500fach geringer, s. Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: Einfluß der Kultivierungstemperatur auf die Titer von 4070A MLV. Die Titer wurden für NIH3T3, BHK-A und BHK21B nach der Endpunktmethode über G418-Selektion infizierter NIH3T3-Zellen bestimmt. Die Bestimmung der Titer von TE FlyA7 erfolgte durch Infektion von HT1080 Zellen. Infizierte Zellen wurden nach der Endpunktmethode durch β -Gal-Färbung quantifiziert. Die Bestimmung der physischen Partikel erfolgte über die Quantifizierung der strong-stop cDNA im Zellkulturüberstand. Die Angaben sind Durchschnittswerte von vier unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung, bei TE FlyA7 wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt.

Zelllinie	Produktionstemperatur	
	32°C	37°C
	Titer [cfu/10 ⁶ Zellen/24h]	Titer [cfu/10 ⁶ Zellen/24h]
NIH3T3	5,9×10 ⁶	6,7×10 ⁷
BHK-A	2,1×10 ³	6,3×10 ³
BHK21B	7,8×10 ²	2,1×10 ³
TE FlyA7	4,1×10 ⁵	4,6×10 ⁵

Die geringeren Titer bei 32°C könnten auf eine verminderte Produktion von 4070A MLV's zurückzuführen sein. Dies wurde durch Gesamtpartikelzahlbestimmungen mit Hilfe der neu entwickelten Filipinfärbung untersucht. Die Analysen ergaben für NIH3T3, BHK-A keine Abnahme in der Bildung von viralen Partikeln bei 32°C. TE FlyA7 entließen sogar circa dreimal soviel und lediglich BHK21B produzierte circa 18% weniger Partikel bei 32°C im Vergleich zu einer Produktion bei 37°C (siehe Abb. 3.11).

NIH3T3 und TE FlyA7 produzieren bei 32°C einen geringeren Anteil infektiöser Viren. Bei BHK-A und BHK21B nimmt der Anteil infektiöser Retroviren an der Produktion von 4070A MLV's dagegen bei 32°C zu (siehe Tabelle 3.3a).

Die Untersuchungen zeigten, daß sowohl bei 37°C als auch bei einer Produktionstemperatur von 32°C die Produktionszelllinie einen entscheidenden Einfluß auf das Verhältnis von infektiösen zu physischen viralen Gesamtpartikeln hat. Der Anteil infektiöser 4070A MLV's nimmt, unabhängig von der Kultivierungstemperatur, in der Reihenfolge TE FlyA7 > NIH3T3 > BHK-A > BHK21B ab.

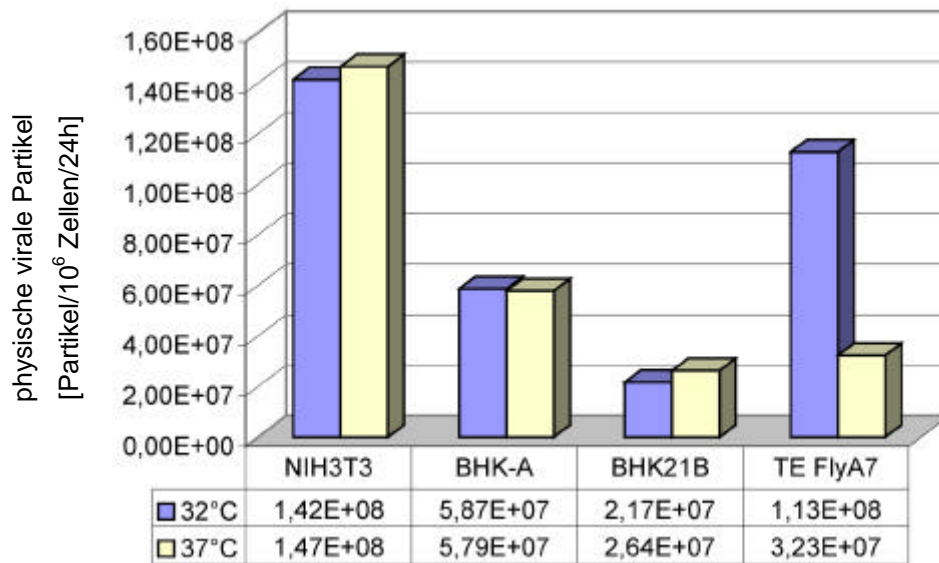


Abb. 3.11: Vergleich der Produktivität der Zelllinien bei 32°C und 37°C. 4070A MLV haltige Überstände von NIH3T3, BHK-A, BHK21B und TE FlyA7 wurden nach 24 Stunden Produktion filtriert (0,45 µm) und die Anzahl der physischen viralen Partikel wurde mit Hilfe der Filipinfärbung bestimmt. Die Werte ergeben sich aus zwei unabhängigen Färbungen (durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert 12,5%).

Tab. 3.3a: Einfluß der Kultivierungstemperatur auf den Anteil infektiöser 4070A MLV's. Die Titer wurden für NIH3T3, BHK-A und BHK21B nach der Endpunktmethode über G418-Selektion infizierter NIH3T3-Zellen bestimmt. Die Bestimmung der Titer von TE FlyA7 erfolgte durch Infektion von HT1080 Zellen. Infizierte Zellen wurden nach der Endpunktmethode durch β-Gal-Färbung quantifiziert. Die Bestimmung der Anzahl der physischen Partikel erfolgte über die Quantifizierung filipingefärbter viraler Partikel aus dem Zellkulturüberstand (Abweichung 12,5%). Die Angaben sind Durchschnittswerte von zwei unabhängigen Färbungen mit parallel durchgeführter Titerbestimmung.

Zelllinie	Anteil der infektiösen Viren an der Gesamtpartikelzahl	
	32°C	37°C
NIH3T3	0,3%	0,9 %
BHK-A	0,018%	0,015 %
BHK 21B	0,009%	0,005 %
TE FlyA7	0,4%	1,4 %

3.1.2.2 Einfluß auf die Stabilität der 4070A MLV

Ein besonderer Augenmerk galt der Untersuchung der Stabilitätseigenschaften der 4070A MLV's, die bei den unterschiedlichen Temperaturen (32°C und 37°C) produziert worden waren.

Im Vorfeld der Experimente war vermutet worden, daß die Absenkung der Temperatur möglicherweise die Eigenschaften der Membran des Virus, verursacht durch eine denkbare Modifikation der Zusammensetzung und Fluidität der Plasmamembran der Produktionszelle, verändern könnte und sich dies unter Umständen in abweichenden Halbwertszeiten äußern würde.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden 4070A Retroviren, produziert bei 32°C und 37°C, bei 4°C gelagert, die jeweiligen Inaktivierungskinetiken ermittelt und daraus die Halbwertszeiten berechnet (siehe auch Abschnitt 3.1.1.3). Die ermittelten Daten sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

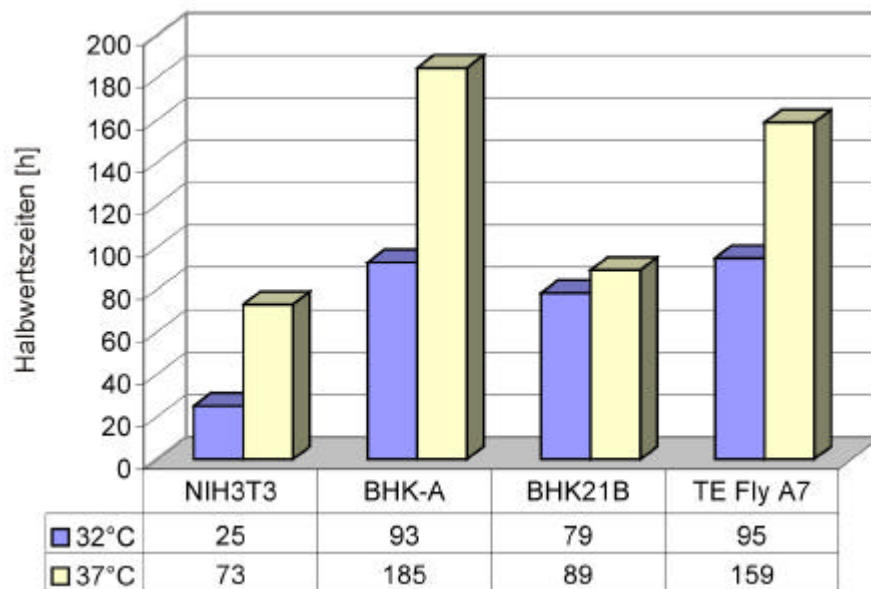


Abb. 3.12: Einfluß der Produktionstemperatur auf die Halbwertszeiten von 4070A MLV's. Die 4070A MLV haltigen Überstände wurden nach 24 Stunden Produktion bei 32°C und 37°C von NIH3T3, BHK-A, BHK21B und TE FlyA7 filtriert (0,45 µm) und bei 4°C gelagert. Nach 0, 24, 48, 96, 192, 384 und 768 Stunden wurde mit einem Aliquot der Viren eine Titerbestimmung auf NIH3T3 oder HT1080 (TE FlyA7-Überstand) durchgeführt. Die Formeln (1) bzw. (2) (siehe Abschnitt 3.1.1.3) dienten dazu, aus den ermittelten Inaktivierungskinetiken die Halbwertszeiten zu berechnen. Die Werte wurden aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung ermittelt, durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert: bei BHK-Zelllinien circa 58%, sonst 3%)

Die Abbildung macht deutlich, welchen entscheidenden Einfluß die Produktionstemperaturen in Abhängigkeit von der Zelllinie auf die Stabilität der 4070A MLV's ausüben. Viren, die von NIH3T3 bei 32°C gebildet werden, weisen eine dreimal geringere Halbwertszeit gegenüber den Viren, die bei 37°C produziert wurden, auf. Das bedeutet, daß die Hälfte der produzierten Viren nicht erst nach drei Tagen, sondern schon nach circa einem Tag inaktiv ist. Bei BHK-A und TE FlyA7 gebildeten Viren ist die Halbwertszeit um das zweifache reduziert. Lediglich von BHK21B freigesetzte 4070A MLV's zeigen einen nicht ganz so deutlich ausgeprägten Effekt durch die Temperaturabsenkung.

Die Reduzierung der thermischen Stabilität der 4070A MLV's wirkt sich auf eine Produktion im Großmaßstab mit ihren langwierigen Aufarbeitungs- und Aufkonzentrierungsprozessen besonders deutlich aus. So wären bei einer Aufarbeitungsdauer von einem Tag bei 4°C die Hälfte aller Viren, die durch NIH3T3 bei 32°C gebildet wurden, allein durch ihre erhöhte Sensibilität inaktiv, während die „37°C“-Viren aufgrund der ausgeprägteren Plateauphase noch ihre vollständige Infektiösität besäßen. Diese erhöhte Instabilität schwächt den Vorteil der erhöhten Virusakkumulation einer Produktion bei 32°C entscheidend ab, so daß nach diesen Ergebnissen eine Produktion von rekombinanten Retroviren bei 32°C nicht uneingeschränkt empfohlen werden kann.

3.2 ANALYSEN DER PRODUKTIONSZELL/RETROVIRUS INTERAKTIONEN

Die Ergebnisse der vorhergehenden Abschnitte verdeutlichen den Einfluß von Zelltyp und Kultivierungsbedingungen auf die Bildung von 4070A MLV's. Die Abhängigkeit der Stabilitätseigenschaften von der Produktionszelllinie und -temperatur haben ihre Ursache vermutlich in einer intensiven wechselseitigen Beeinflussung von Produktionszelle und 4070A MLV. Abweichungen in den Kultivierungsbedingungen, z.B. bei einer Temperaturabsenkung, könnten zu Modifikationen der Zellen und ihrer Genexpression führen, die sich schließlich auch auf die viralen Eigenschaften auswirken.

Eine Möglichkeit, einen Überblick über die unterschiedliche Expression von Genen, z.B. nach Änderungen der Kultivierungsbedingungen, zu erhalten, steht mit der Entwicklung der soge-

nannten Microarray-Technologie zur Verfügung. Durch sie ist es möglich, die Regulation mehrerer tausend Gene gleichzeitig zu überprüfen. Besonders vorteilhaft wird dies, wenn nicht bekannt ist, welche Gene und Genfamilien von einer Regulation betroffen sind. Aus diesem Grund wurde die Microarray-Technologie benutzt, um einen Anhaltspunkt zu erhalten, welchen Einfluß die Absenkung der Temperatur auf 32°C auf die Zellen hat und inwieweit sich dadurch die Stabilitätsunterschiede von 32°C zu 37°C produzierten 4070A MLV's erklären lassen.

3.2.1 EINFLUß DER KULTIVIERUNGSTEMPERATUR AUF PRODUKTIONSZELLE UND VIRUSSTABILITÄT

Um einen Anhaltspunkt zu erhalten, welche Auswirkungen eine Absenkung der Temperatur auf die Zellen hat, wurde RNA von mock-infizierten und 4070A produzierenden NIH3T3 nach einer 24 stündigen Kultivierung bei 32°C und 37°C isoliert und eine Microarray basierte Analyse der Genexpression durchgeführt. Dadurch konnten gleichzeitig bei 1176 Genen die Expressionslevel auf Transkriptionsebene evaluiert werden. Die Untersuchungen wurden an mock-transfizierten und 4070A produzierenden NIH3T3 durchgeführt, um mögliche Effekte durch die Virusproduktion auszuschließen.

Von den 1176 untersuchten Genen war aufgrund der Temperatursenkung die Genexpression bei circa 10% der Gene verändert (117 Gene bei mock-transfizierten und 125 Gene bei 4070A MLV produzierenden NIH3T3). In Tabelle 3.4 sind beispielhaft die wichtigsten Genfamilien aufgeführt, die durch die Absenkung der Kultivierungstemperatur von 37°C auf 32°C reguliert sind. Die Auflistung macht deutlich, welche vielfältigen Funktionen und Bereiche der Zelle betroffen sind. Das reicht über so grundlegende Zellfunktionen wie die Transkription und die Translation bis hin zu Genen, die bei Tumorentwicklungen eine Rolle spielen. Inwieweit die Virusproduktion die Expression der Gene zusätzlich beeinflusst, soll in späteren Abschnitten erörtert werden.

Tab. 3.4: Auflistung der wichtigsten Genfamilien, die mit Änderungen in ihrer Genexpressionshöhe auf eine Temperaturabsenkung von 37°C auf 32°C reagieren.

NIH3T3 (mock-transfiziert und 4070A MLV's produzierend) wurden für 24 Stunden bei 32°C und 37°C kultiviert, anschließend die zelluläre RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die radioaktiv markierte cDNA wurde auf dem Atlas Mouse 1.2 Array II (Clontech) hybridisiert und die Signale mit einem PhosphorImager ausgewertet.

Gene mit Funktion bei:	Anzahl der Gene, die veränderte Genexpression bei 32°C zeigen	
	mock-transfizierte NIH3T3	4070A MLV's produzierende NIH3T3
Apoptose	5	6
Cholesterinmetabolismus	5	4
Cytoskelett	5	13
Endo- und Exocytose	3	2
Fettsäuremetabolismus	1	2
Proteasen	6	7
Proteinfaltung und -zusammenbau	3	5
Transport und Metabolismus von RNA	1	8
Signaltransduktion	7	2
Stoffwechsel der Zelle	10	11
Hitzeschock	1	2
Transkription	9	3
Translation	2	6
Tumorentwicklung	13	12
Zellzyklus/Zellteilung	8	11


Bei der Auswertung des Arrays galt das Hauptaugenmerk den Genen, deren abweichende Expression einen Einfluß auf die Membranzusammensetzung der Zelle und somit auch auf die viralen Stabilitätseigenschaften haben könnten. Die Änderung der Expressionsstärke von Genen, die an der Cholesterinbiosynthese und der Aufrechterhaltung des Cholesteringehaltes der Zelle beteiligt sind, war deshalb von besonderem Interesse. Ein Teil der betroffenen Gene mit den dazugehörigen Microarray-Signalen und den Änderungen in der Genexpressionshöhe ist in Tabelle 3.5 aufgeführt. Da sowohl mock-transfizierte als auch 4070A MLV produzierende NIH3T3 diese Effekte zeigten, wird davon ausgegangen, daß dies durch die Absenkung der Temperatur auf 32°C hervorgerufen wurde.

Die Art der Regulation der in Tabelle 3.5 aufgeführten Gene deutet auf einen erhöhten Cholesteringehalt der Zelle nach einer 24 stündigen Kultivierung bei 32°C hin. So sind Gene von

Proteinen, die einer erhöhten Cholesterinkonzentration entgegenwirken, bei 32°C hochreguliert. Dazu gehört z.B. CNBP (cellular nucleic acid binding protein), das die Expression von Schlüsselenzymen der Cholesterinbiosynthese, wie der HMG-CoA-Reduktase, herunterreguliert. Dagegen ist die Expression der Lysophospholipase 1, die die Hydrolyse von Cholesterinestern zu Cholesterin katalysiert, reduziert. Da Cholesterin als Ester gespeichert wird, der bei niedrigem Cholesteringehalt der Zelle wieder in Cholesterin umgewandelt wird, kann dies ebenfalls als Zeichen eines erhöhten Cholesterinlevels gewertet werden.

Tab.3.5: Regulation der Expression von Genen der Cholesterin Homöostase

NIH3T3 (mock transfiziert und 4070A MLV's produzierend) wurden für 24 Stunden bei 32°C und 37°C kultiviert, anschließend die zelluläre RNA isoliert und diese mit genspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben. Die radioaktiv markierte cDNA wurde auf dem Atlas Mouse 1.2 Array II (Clontech) hybridisiert und die Signale mit einem PhosphoImager ausgewertet. Der Faktor der Regulation ergibt sich aus dem jeweiligen Verhältnis von 32°C zu 37°C. Werte kleiner 0 bedeuten somit eine Herunterregulation, Werte größer 0 eine Hochregulation der Genexpression nach Absenkung der Temperatur auf 32°C. Die Grenze für eine Regulation lag bei +/-1,4.

Gen	32°C mock	37°C mock	Faktor mock	Faktor Virusprod.	32°C Virusprod.	37°C Virusprod.
Benzodiazepin Rezeptor			-1,8	-1,8		
Lysophospholipase 1			-1,5	-		
CNBP			1,9	2,4		
Lanosterol 14alpha Demethylase			-	2,2		
LDL Rezeptor assoziiertes Protein 1			-	1,7		

Daneben könnte das Expressionsmuster des Benzodiazepin Rezeptors, der Lanosterin 14alpha Demethylase und des LDL Rezeptor assoziierten Proteins 1 zu einer Erhöhung des Cholesterinspiegels in der Zelle führen. Der Benzodiazepin Rezeptor, ein Schlüsselprotein für den Transport von Cholesterin in die Mitochondrien, der die Initiation der Steroidhormonbildung aus Cholesterin ermöglicht, ist herunterreguliert. Die verstärkte Expression der Lanosterol

14alpha Demethylase, die an der Umwandlung von Lanosterin zu Cholesterin beteiligt ist, und des LDL Rezeptor assoziierten Proteins 1 sowie die erwähnte Herunterregulierung des Benzodiazepin Rezeptors könnten auf eine verstärkte Bildung, Anreicherung und Aufnahme von Cholesterin hindeuten.

3.2.1.1 Änderung des Cholesteringehaltes von Zellen durch die Kultivierung bei 32°C

Aber eine Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene muß nicht in jedem Fall funktionell nachweisbare Auswirkungen auf die Zelle haben. Aus diesem Grund wurde die zelluläre Cholesterinkonzentration mit Hilfe von enzymatischen Nachweisreaktionen überprüft.

Für diese Untersuchungen wurden 4070A MLV produzierende NIH3T3 24 Stunden bei 32°C und 37°C inkubiert und anschließend der Cholesteringehalt pro Zelle bestimmt (siehe Abbildung 3.13).

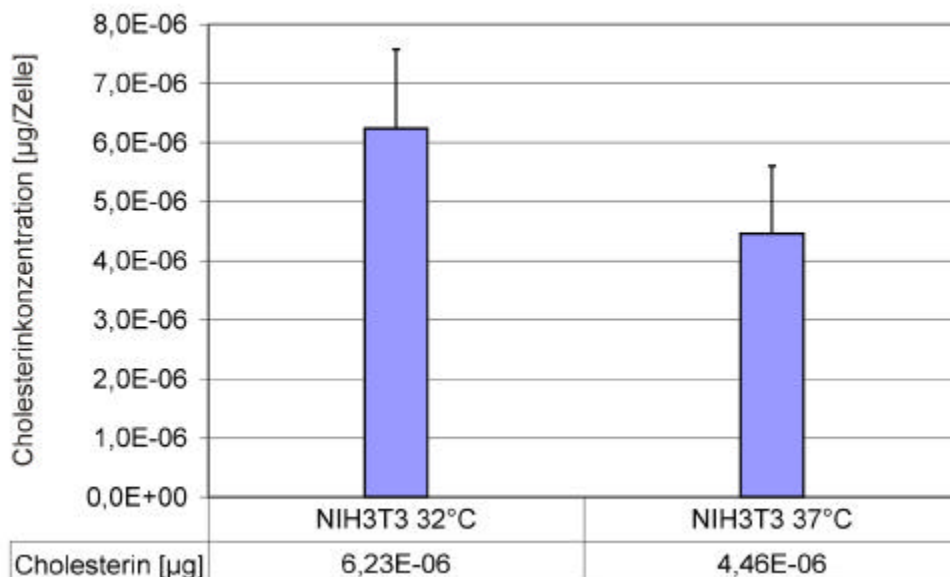


Abb. 3.13: Einfluß der Kultivierungstemperatur auf den Cholesteringehalt von 4070A produzierenden NIH3T3. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 32°C und 37°C kultiviert, aufgeschlossen und enzymatisch der Cholesteringehalt mit dem Infinity™ Cholesterol Reagent von Sigma bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert von 7 unabhängigen Messungen in Zwei- und Dreifachbestimmungen.

Die enzymatische Bestimmung des zellulären Cholesterins zeigte eine Zunahme des Cholesteringehaltes von Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1), die bei 32°C inkubiert wurden. Die Absenkung der Temperatur auf 32°C verursacht eine Erhöhung des Cholesterinspiegels um das 1,4 fache gegenüber der Kultivierung bei 37°C (siehe Abb. 3.13).

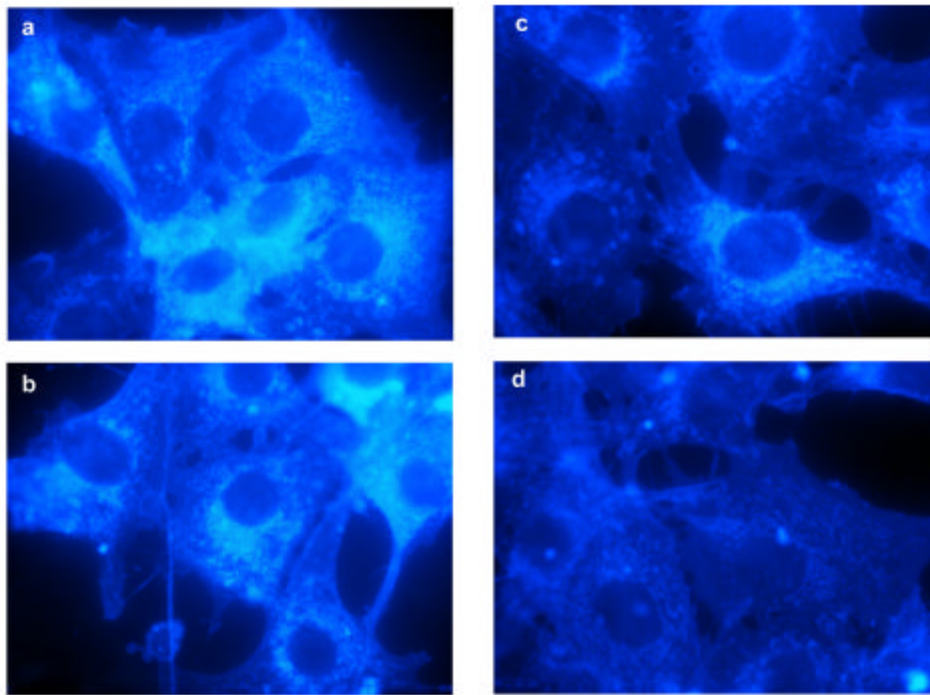


Abb. 3.14: Färbung des Cholesterins der zellulären Plasmamembran von NIH3T3 nach Kultivierung bei 32°C und 37°C. a) und b) Kultivierung bei 32°C; c) und d) Kultivierung bei 37°C; 4070A MLV produzierende NIH3T3 wurden in Chamber-Slides ausgesät, 24 Stunden bei 32°C oder 37°C inkubiert, mit Paraformaldehyd fixiert und das Cholesterin der Plasmamembran mit Filipin angefärbt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Originalvergrößerung 1000×

Der verwendete InfinityTM Cholesterol Test (Sigma) erfaßt Cholesterin und seine Speicherform (Cholesterinester), so daß eine erhöhte Gesamtcholesterinkonzentration nicht unbedingt auf eine vermehrte Anlagerung von Cholesterin in der Plasmamembran, sondern auch auf eine verstärkte Speicherung von Cholesterin in den Zellen zurückzuführen sein könnte.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde das Cholesterin der zellulären Plasmamembran mit Hilfe von Filipin gefärbt (siehe Abbildung 3.14). Dieses Antibiotikum bindet spezifisch an Cholesterin, so daß dieses über die fluorogenen Eigenschaften des Filipins indirekt sichtbar gemacht werden kann. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, daß der erhöhte Gesamtcholesteringehalt auch eine verstärkte Präsenz von Cholesterin in der Plasmamembran

nach sich zieht. Die Auswertung einer Färbung von NIH3T3, die bei 32°C oder 37°C in Mikrotiterplatten kultiviert wurden, mit einem Fluoreszenz-Mikrotiterplattenmeßgerät zeigte eine 1,34 fache Steigerung des Cholesteringehaltes in der Plasmamembran (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.2 Einfluß des Cholesteringehaltes der zellulären Plasmamembran auf den Cholesteringehalt der viralen Membran

Die Absenkung der Kultivierungstemperatur führt zu einer erhöhten Cholesterinkonzentration in der Plasmamembran. Um zu klären, inwieweit sich dies auf den Cholesteringehalt der viralen Membranen auswirkt, wurden NIH3T3 produzierte 4070A MLV's über Ultrazentrifugation pelletiert und enzymatisch die Cholesterinkonzentration bestimmt. Gleichzeitig wurde die Anzahl der viralen Partikel mit Hilfe der Filipinfärbung ermittelt und der Cholesteringehalt pro Partikel berechnet.

Da sich die virale Membran des 4070A MLV aus der zellulären Plasmamembran bildet, wurde erwartet, daß die Cholesterinerhöhung in der Plasmamembran der Produktionszelle auch zu einer erhöhten Cholesterinkonzentration in der viralen Membran führt. Diese Vermutung konnte durch mehrere unabhängige Versuche bestätigt werden (siehe Abbildung 3.15). Interessanterweise kommt es bei den Viren sogar zu einer stärkeren Anreicherung von Cholesterin als in der zellulären Plasmamembran. So ist gegenüber den 4070 MLV's, die bei 37°C gebildet wurden, nach einer Produktion bei 32°C mehr als dreimal soviel Cholesterin in den viralen Membranen nachzuweisen, während es in den NIH3T3 Zellen lediglich zu einer circa 1,4 fachen Anreicherung von Cholesterin kam.

Geringe Änderungen des Cholesteringehaltes der zellulären Plasmamembran bewirken demnach eine deutlich erhöhte Cholesterinkonzentration in den Viren. Offenbar kommt es in der viralen Membran zu einer Aufkonzentrierung von Cholesterin.

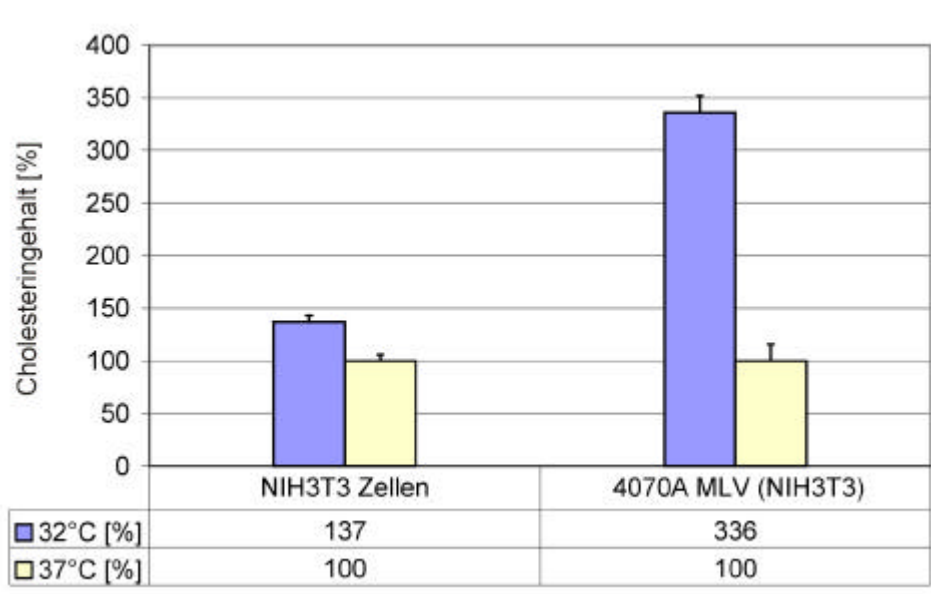


Abb. 3.15: Einfluß der Kultivierungstemperatur auf die Cholesterinkonzentration von 4070A produzierenden NIH3T3 und den gebildeten 4070A MLV's. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 32°C und 37°C kultiviert, aufgeschlossen und enzymatisch der Cholesteringehalt pro Zelle mit dem InfinityTM Cholesterol Reagent von Sigma bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen in Zwei- und Dreifachbestimmungen. 4070A MLV wurden für 24 Stunden bei 32°C und 37°C produziert, filtriert (0,45 µm), durch Ultrazentrifugation pelletiert und der Cholesteringehalt pro viralem Partikel bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen in Achtfachbestimmung. Die Cholesterinwerte bei 32°C Kultivierung bzw. Produktion wurden mit den 37°C Werten in Relation gesetzt (37°C als 100%).

Anschließend wurde die Cholesterinkonzentration der Hamsterzelllinien BHK-A und BHK21B und der von ihnen gebildeten 4070A MLV's bestimmt und mit dem NIH3T3-System verglichen (siehe Abb. 3.16). Um die zum Teil erheblichen Größenunterschiede zwischen den Zellen zu berücksichtigen, wurde der Cholesteringehalt auf ein µg Protein bezogen. BHK-A und BHK21B haben einen circa 50% geringeren Gehalt an Cholesterin als NIH3T3. Die niedrigeren Konzentrationen spiegeln sich auch in der Höhe der Cholesterineinlagerung in den Membranen der produzierten Viren wider, bei denen etwa 5 bis 6 mal weniger Cholesterin als bei NIH3T3 gebildeten Viren nachzuweisen ist. Das bedeutet, daß auch BHK-A und BHK21B Produktionszellen die Beschaffenheit der Membran von 4070A Viren beeinflussen und der Cholesteringehalt in den Viren davon abhängig ist, wieviel Cholesterin in den Membranen der Produktionszelle vorhanden ist.

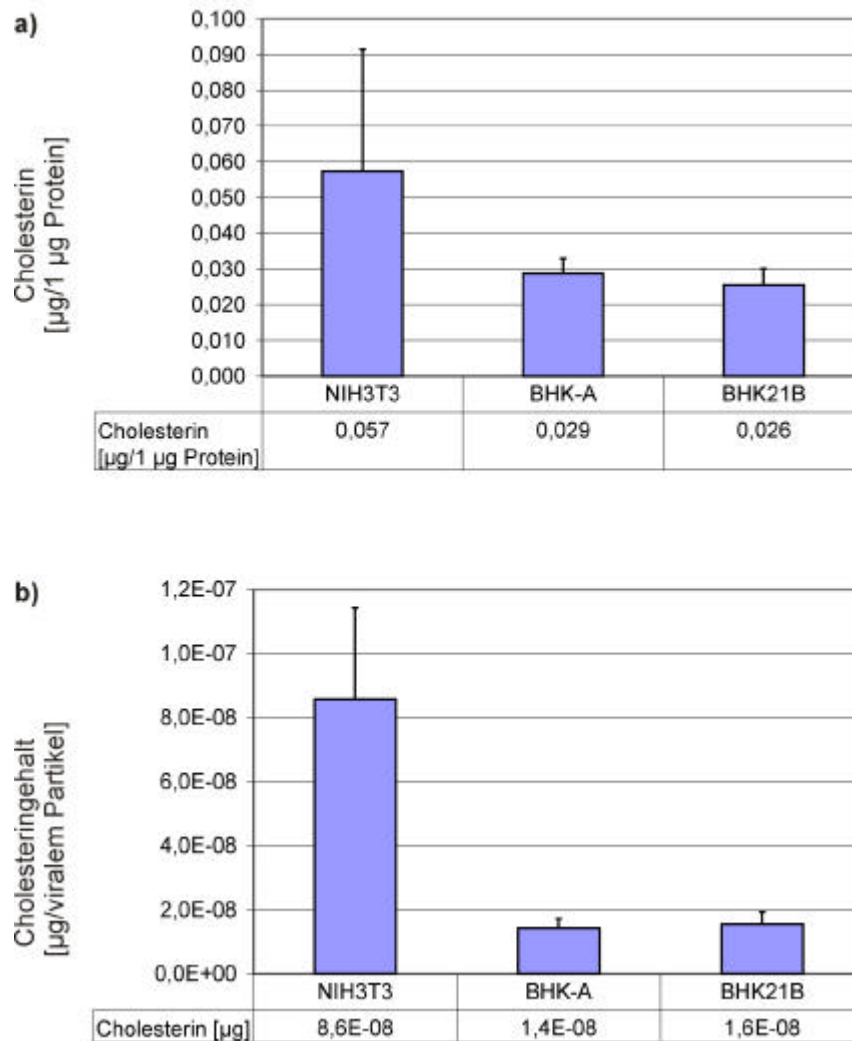


Abb. 3.16: Vergleich des Cholesteringehaltes von Produktionszellen mit den von ihnen gebildeten 4070A MLV. a) Gehalt an Cholesterin pro µg Protein; **b)** Cholesteringehalt pro physischem viralen Partikel (Partikelbestimmung über Filipinfärbung). NIH3T3, BHK-A und BHK21B wurden für 24 Stunden bei 32°C kultiviert, aufgeschlossen und enzymatisch der Cholesteringehalt pro Zelle mit dem Infinity™ Cholesterol Reagent von Sigma bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus 7 (NIH3T3) und 4 (BHK-A, BHK21B) unabhängigen Messungen in Zwei- und Dreifachbestimmung. 4070A MLV wurden für 24 Stunden bei 32°C kultiviert, filtriert (0,45 µm), durch Ultrazentrifugation pelletiert und der Cholesteringehalt pro viralem Partikel bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen in Achtfachbestimmung.

3.2.1.3 Einfluß des Cholesteringehaltes auf die virale Stabilität

Die Verringerung der Kultivierungstemperatur für die Produktion von 4070A Retroviren auf 32°C erhöht die thermische Instabilität der gebildeten Viren bis zu einem Faktor von 3.

Gleichzeitig führt dies zur Erhöhung der Cholesterinkonzentration in der Membran der Produktionszellen und den von ihnen gebildeten Viren.

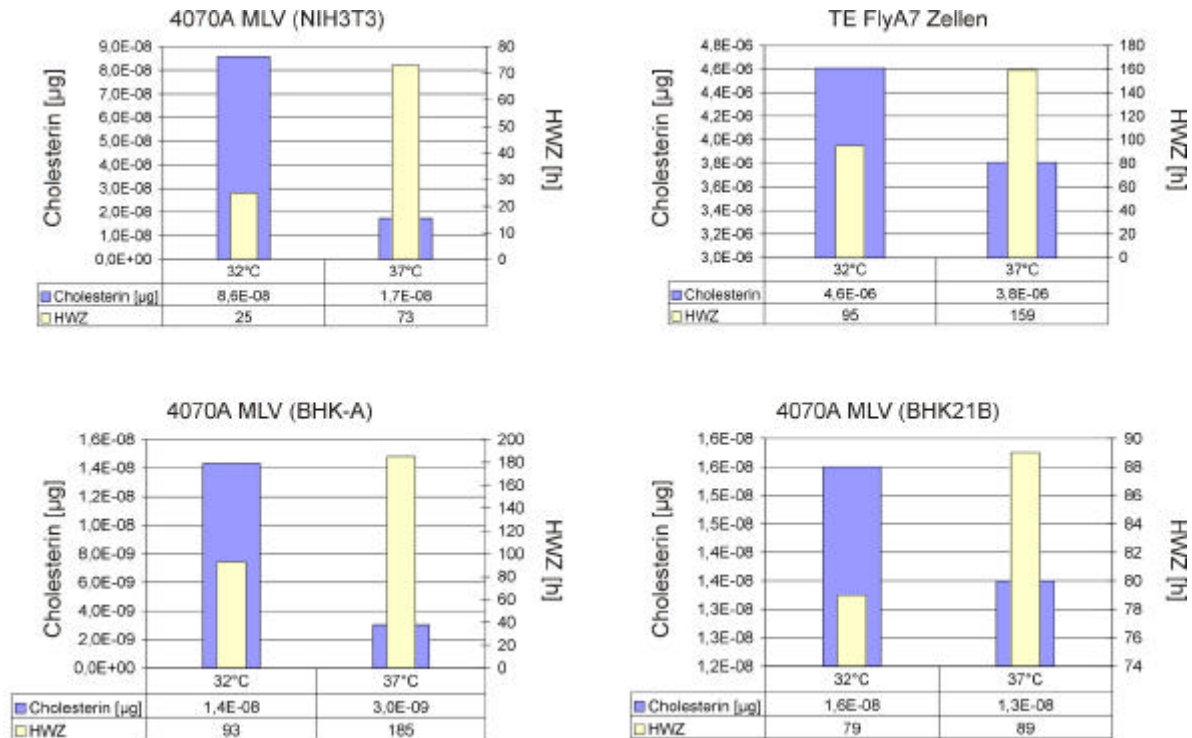


Abb. 3.17: Cholesteringehalt von viralen oder zellulären Membranen und die Halbwertszeit von 4070A MLV. TE FlyA7 wurden für 24 Stunden bei 32°C kultiviert, aufgeschlossen und enzymatisch der Cholesteringehalt pro Zelle mit dem Infinity™ Cholesterol Reagent von Sigma bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen in Zwei- und Dreifachbestimmung. 4070A MLV, produziert von NIH3T3, BHK-A und BHK21B für 24 Stunden bei 32°C, wurden filtriert (0,45 µm), durch Ultrazentrifugation pelletiert und der Cholesteringehalt pro viralem Partikel bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen in Achtfachbestimmung. Für die Bestimmung der Halbwertszeit wurde 4070A MLV haltiger Überstand nach 24 Stunden Produktion von NIH3T3, BHK-A, BHK21B und TE FlyA7 filtriert (0,45 µm) und bei 4°C gelagert. Nach 0, 24, 48, 96, 192, 384 und 768 Stunden wurde mit einem Aliquot der Viren eine Titerbestimmung auf NIH3T3 oder HT1080 (TE FlyA7-Überstand) durchgeführt. Aus den ermittelten Inaktivierungskinetiken wurden die Halbwertszeiten berechnet. Die Werte wurden aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung ermittelt, durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert: bei BHK-Zelllinien circa 58%, sonst 3%.

Ein erster Hinweis, daß die Cholesterinkonzentration der Produktionszelle bzw. der gebildeten Viren und die Stabilität der Viren zusammenhängen, ergab sich durch den Vergleich des Cholesteringehaltes der Viren bzw. Zellen und der jeweiligen Halbwertszeit (siehe Abbildung 3.17). Die Erhöhung des Cholesterins durch die Kultivierung der Zelllinien (NIH3T3, BHK-A, BHK21B und TE FlyA7) bei 32°C resultiert in einer reduzierten Halbwertszeit der von ihnen gebildeten Viren. Dabei ist die Stärke des Einflusses der Kultivierungstemperatur auf den

Cholesteringehalt und die Halbwertszeit von der Zelllinie abhängig. Während BHK21B produzierte Viren lediglich 1,2 mal mehr Cholesterin beinhalten, erhöht sich die Cholesterinkonzentration von NIH3T3 gebildeten 4070A MLV's um 5,1 und von BHK-A produzierten 4070A MLV's um 4,7. Sollte Cholesterin den vermuteten Einfluß auf die viralen Stabilitätseigenschaften ausüben, sollte sich dies auch in den Halbwertszeiten der produzierten Viren widerspiegeln. Eine geringe Änderung im Cholesteringehalt der viralen Membran würde kaum eine Änderung der viralen Stabilitätseigenschaften nach sich ziehen, währenddessen eine stärkere Erhöhung der Cholesterinkonzentration einen merklichen Einfluß auf die viralen Stabilitätseigenschaften haben sollte.

Erste Untersuchungen konnten diesen Zusammenhang bestätigen. Während die Halbwertszeit der Viren aus BHK21B bei der Produktion bei 32°C nur um Faktor 1,1 sinkt, verringert sie sich bei NIH3T3 und BHK-A um Faktor 3 bzw. 2.

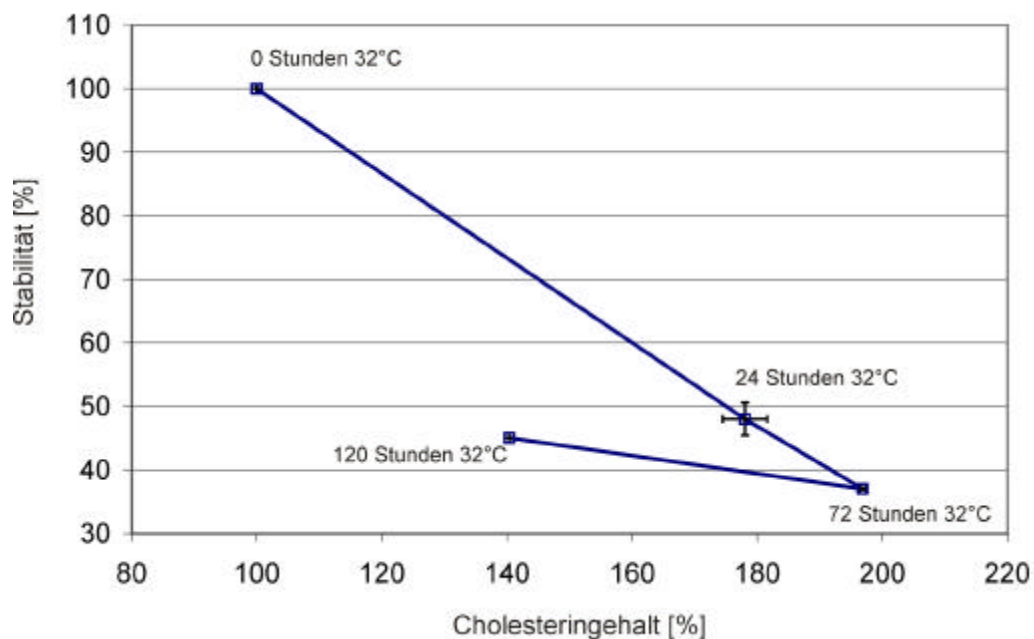


Abb. 3.18: Abhängigkeit der Stabilität von 4070A MLV vom Cholesteringehalt der Produktionszellen, NIH3T3 wurden 24 bzw. 72 Stunden bei 32°C und 37°C kultiviert und enzymatisch der Cholesteringehalt pro Zelle mit dem Infinity™ Cholesterol Reagent von Sigma bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Messungen in Zwei- und Dreifachbestimmung. Gleichzeitig wurde von den Zellen der 4070A MLV haltige Überstand filtriert (0,45 µm) und die Stabilität der 4070A MLV's durch den Anteil an infektiösen Viren nach 5 Tagen Lagerung bei 4°C über die Endpunkttitermethode ermittelt. Die analysierten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt (32°C : 37°C) und die Zunahme bzw. Abnahme des Cholesteringehaltes und der viralen Stabilität prozentual zum Ausgangswert (37°C; 0 Stunden 32°C) bestimmt.

Zur Produktion von Retroviren für den Einsatz in gentherapeutischen Applikationen wird von einigen Autoren die Produktion bei 32°C empfohlen. Aufgrund einer verstärkten Akkumulation von aktiven Viren erhöht sich dadurch der virale Titer nach mehreren Tagen Produktion bis zu 20fach [26, 33]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß längere Kultivierungszeiten von NIH3T3 bei 32°C jedoch zu einer weiteren Zunahme des zellulären Cholesteringehaltes führen. Dies macht sich wiederum in einer Verschlechterung der viralen Stabilitätseigenschaften und der Verringerung der viralen Halbwertszeiten bemerkbar (siehe Abbildung 3.18). So erhöht sich die Cholesterinkonzentration nach drei Tagen bei 32°C auf fast 200% im Vergleich zum Cholesteringehalt bei 37°C, während die Stabilität der gebildeten 4070A MLV's gleichzeitig auf unter 40% sinkt. Diese Tendenz setzt sich jedoch nicht beliebig fort. Nach fünf Tagen sinkt der Cholesteringehalt wieder langsam, während die Stabilität der Viren leicht zunimmt.

Der lineare Zusammenhang zwischen Cholesteringehalt und Stabilität der 4070A Retroviren (s. Abb. 3.18) verstärkte die Vermutung, daß die erhöhte Cholesterinkonzentration, verursacht durch die 32°C Kultivierungstemperatur, der Grund für die verstärkte thermische Instabilität der Viren ist. Der direkte Beweis dieser Hypothese kann durch die Depletion von Cholesterin aus der Plasmamembran erfolgen. Die so verringerte Cholesterinkonzentration sollte zu einer Erhöhung der viralen Stabilität führen. Von der Verwendung von Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese wurde nach anfänglichen Versuchen abgesehen, da diese vielfältige Änderungen in der Zelle bewirken, deren Wirkung auf die Produktion der Viren und ihrer Eigenschaften unbekannt sind. Die Extraktion von Cholesterin aus biologischen Membranen kann mit Hilfe von Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD) erfolgen. Methyl- β -Cyclodextrin ist ein ringförmiges Molekül, das aus 7 α -1,4-verknüpften Glukoseeinheiten besteht, in deren Inneren hydrophobe Gastmoleküle, wie z.B. Cholesterin, eingeschlossen werden können.

Die Untersuchungen wurden an NIH3T3 und den durch diese Zelllinie gebildeten 4070A MLV's durchgeführt, da diese den stärksten Einfluß auf die virale Stabilität, hervorgerufen durch die Temperaturänderung, zeigten.

Vorab wurde die Effizienz der Cholesterinextraktion aus zellulären Plasmamembranen und viralen Membranen an NIH3T3 und deren produzierten Viren untersucht. Dazu wurden zum

einen enzymatische Cholesterinbestimmungen und zum anderen Färbungen des Cholesterins mit Filipin durchgeführt.

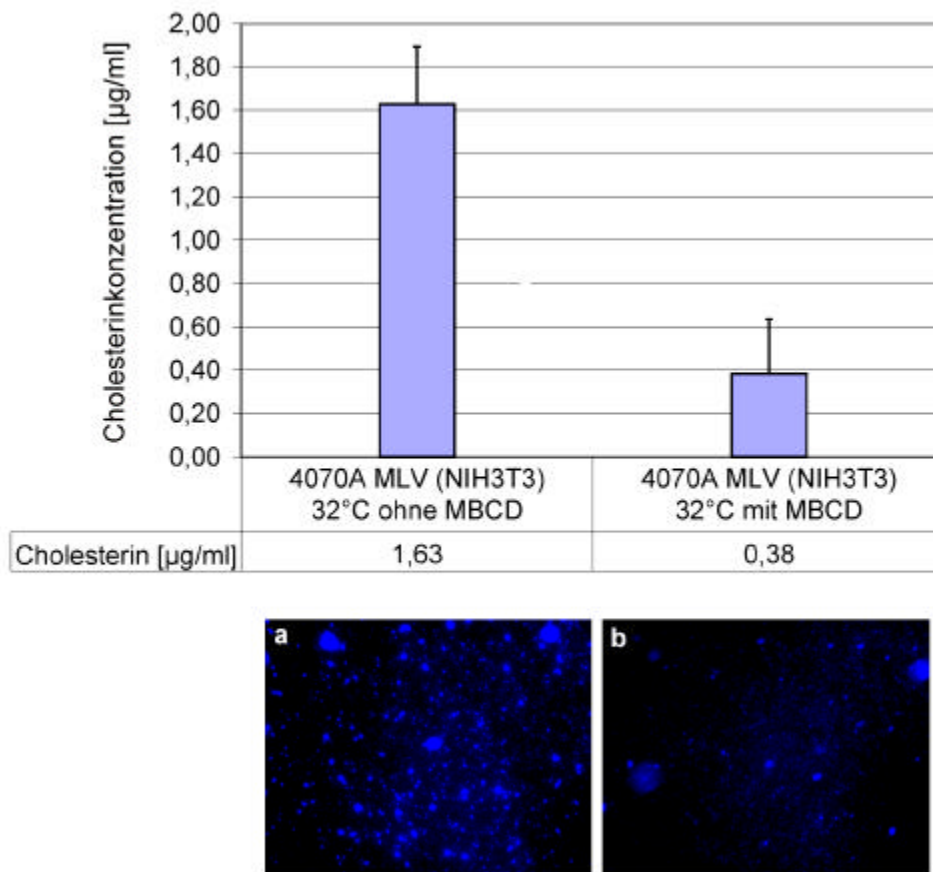


Abb. 3.19: Nachweis der Extraktion von Cholesterin aus der Membran von 4070A MLV durch Methyl- β -Cyclodextrin. 4070A MLV (produziert von NIH3T3 bei 32°C) wurden über Größenausschlußfiltration aufkonzentriert und je ein Aliquot mock und mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin behandelt. Der Cholesteringehalt der behandelten und unbehandelten Virussuspension wurde enzymatisch mit dem InfinityTM Cholesterol Reagenz bestimmt. Ein Teil der Viren wurde auf Glasobjektträger mit Polybrene fixiert und das Cholesterin der viralen Membran mit Filipin angefärbt. **a)** 4070A MLV ohne MBCD-Behandlung; **b)** 4070A MLV mit MBCD-Behandlung. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Originalvergrößerung 1000 \times

Durch die Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin konnten bei den 4070A Retroviren bis zu 77% des Cholesterins aus den Membranen extrahiert werden. Filipinfärbungen des Cholesterins der viralen Membran bestätigten die Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen (siehe Abbildung 3.19). Die Aufnahmen zeigen eine deutlich schwächere Fluoreszenz nach Behandlung der Viren mit Methyl- β -Cyclodextrin, was auf eine geringere Cholesterinkonzentration der Membranen schließen läßt.

Demnach ist es möglich, mit MBCD den Gehalt an Cholesterin in viralen Membranen zu senken. Um zu zeigen, daß die Cholesterinkonzentration der viralen Membran und die virale Stabilität im Zusammenhang stehen, wurden die 4070A MLV's von NIH3T3 bei 32°C und 37°C produziert und jeweils ein Teil der Viren mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelt. Die nicht behandelten Viren wurden ansonsten völlig identisch behandelt, um einen Einfluß der Aufarbeitungsmethoden auf die Stabilität der Viren auszuschließen. Die Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe der Größenausschlußfiltration (Molekulargewichtstrenngrenze 50000 MW) mit der gleichzeitig das Methyl- β -Cyclodextrin nach erfolgter Behandlung der Viren wieder entfernt werden und eine Beeinflussung der Bestimmung des viralen Titters durch das MBCD ausgeschlossen werden konnte.

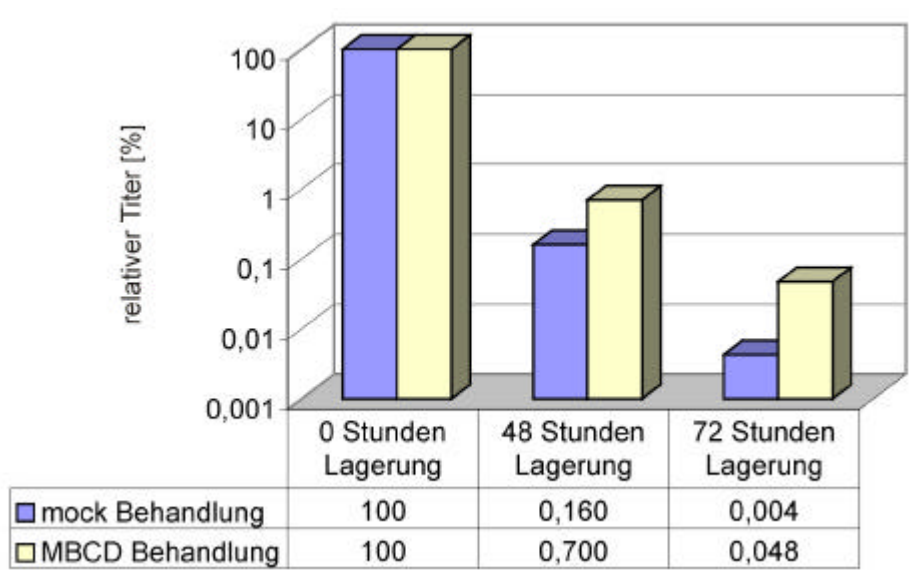


Abb. 3.20: Einfluß der Cholesterinkonzentration der Membran von 4070A MLV auf die thermische Stabilität der Viren. 4070A MLV (produziert von NIH3T3 bei 32°C) wurden mit Hilfe der Größenausschlußfiltration aufkonzentriert, mit Methyl- β -Cyclodextrin das Cholesterin aus der viralen Membran extrahiert (durchschnittlich wurden 77% entfernt) und die Virussuspension bei 4°C gelagert. Die Titerbestimmung erfolgte auf NIH3T3 mit der Endpunktmethode. Gezeigt sind die Daten aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen bei denen die Viren 2 und 3 Tage bei 4°C gelagert wurden. Gezeigt ist der Prozentsatz infektiöser Viren relativ zum Ausgangstiter zum Zeitpunkt 0.

Die teilweise Entfernung von Cholesterin aus den viralen Membranen führt zur Zunahme der thermischen Stabilität der Viren (siehe Abbildung 3.20). So sind nach 2 tägiger Lagerung bei 4°C viermal mehr und nach 3 tägiger Lagerung sogar zwölfmal mehr aktive Retroviren vorhanden, wenn den Viren durch Methyl- β -Cyclodextrin Cholesterin entzogen wurde. Der ver-

mutete Zusammenhang zwischen Cholesterinkonzentration und Stabilität konnte somit durch diese Experimente bestätigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Absenkung der Temperatur auf 32°C für die Produktion von 4070A MLV in einer erhöhten Cholesterinkonzentration der Plasmamembran der Produktionszellen resultiert, die eine Anhebung des Cholesterinspiegels in den viralen Partikeln nach sich zieht. Diese Veränderung in der Zusammensetzung der viralen Membran ist nachweislich der Grund für die beobachtete verstärkte thermische Instabilität der 4070A Retroviren, die bei 32°C produziert wurden.

Für Produktionen, die Aufarbeitungsprozeduren erfordern, deren Zeitaufwand im Bereich der viralen Halbwertszeiten liegen, kann deshalb eine Produktion bei 32°C nur bedingt empfohlen werden. Vor einer Produktion sollte der mögliche Einfluß auf die viralen Stabilitätseigenschaften untersucht werden.

3.2.2 BEDEUTUNG DES CHOLESTERINS FÜR DEN LEBENSZYKLUS DES 4070A MLV

Cholesterin spielt bei mehreren viralen Prozessen eine wichtige Rolle. Neben dem hier dargelegten Einfluß auf die virale Stabilität von 4070A MLV zeigten mehrere Autoren für andere umhüllte Viren, wie dem ecotropen MoMLV, HIV, Masernvirus und Influenzavirus, die Bedeutung des Cholesterins für den Infektionsprozeß sowie den Zusammenbau und die Freisetzung der Viren [52, 75-81]. So ist z.B. der Rezeptor für das ecotrope Moloney MLV vermutlich in den Caveolae lokalisiert, deren Zerstörung die Infektion der Wirtszellen mit dem MoMLV erheblich beeinträchtigt.

Caveolae, wie auch Rafts, sind cholesterinreiche Mikrodomänen in der zellulären Plasmamembran, die eine wichtige Rolle bei der Sortierung und Konzentrierung von Membranproteinen, wie z.B. den Rezeptoren für das MoMLV, spielen [53]. Der Aufbau dieser Strukturen ist abhängig von der Anwesenheit des Cholesterins, und die Extraktion desselben aus der Membran der Zelle führt zur Auflösung und Zerstörung der Rafts und Caveolae [47]. Um den Einfluß und die Beteiligung der Rafts und Caveolae auch am Infektionsprozeß von 4070A

MLV nachzuweisen, wurden die Rafts und Caveolae durch die Extraktion von Cholesterin aus der Wirtszelle zerstört. Dies kann mit Hilfe von MBCD geschehen. Vor den Infektionsversuchen wurde die Entfernung von Cholesterin aus der zellulären Plasmamembran mit enzymatischen Messungen und der Färbung mit Filipin überprüft. Die Behandlung führte zu einer bis zu 37%igen Reduktion des Cholesteringehaltes der Membran (Daten nicht gezeigt), was durch Filipinfärbungen bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 3.21).

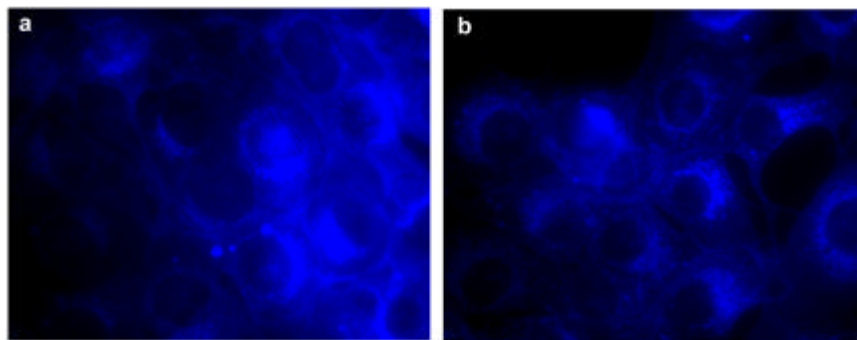


Abb. 3.21: Extraktion von Cholesterin aus der zellulären Plasmamembran durch Methyl- β -Cyclodextrin. a) NIH3T3 ohne MBCD-Behandlung; b) NIH3T3 mit MBCD-Behandlung; NIH3T3-Zellen wurden auf Chamber-Slides ausgesät, für 1 Stunde mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin inkubiert, mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Filipin das Cholesterin der Plasmamembran angefärbt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Originalvergrößerung 1000 \times

Für die Untersuchungen der Beteiligung der Rafts und Caveolae am Infektionsprozeß durch 4070A MLV's wurden NIH3T3-Zellen mit 5 mM MBCD behandelt und mit 4070A MLV infiziert. Die Anzahl der infizierten gfp-positiven Zellen wurde zum einen mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und zum anderen durch FACS-Messungen ermittelt.

Die durch die MBCD-Behandlung induzierte Auflösung der Rafts und Caveolae führte zu einer über 50%igen Reduktion der Infizierbarkeit durch 4070A MLV im Vergleich zu nicht behandelten NIH3T3-Zellen (siehe Abbildung 3.22). Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals für das hier untersuchte amphotrope 4070A MLV gezeigt werden, daß die cholesterinreichen Regionen, die Rafts und Caveolae, eine wichtige Rolle bei dem viralen Infektionsprozeß spielen. Vermutlich ist, ebenso wie der Rezeptor für das ecotrope MoMLV [76], auch der Rezeptor für das 4070A MLV in den Rafts bzw. Caveolae lokalisiert.

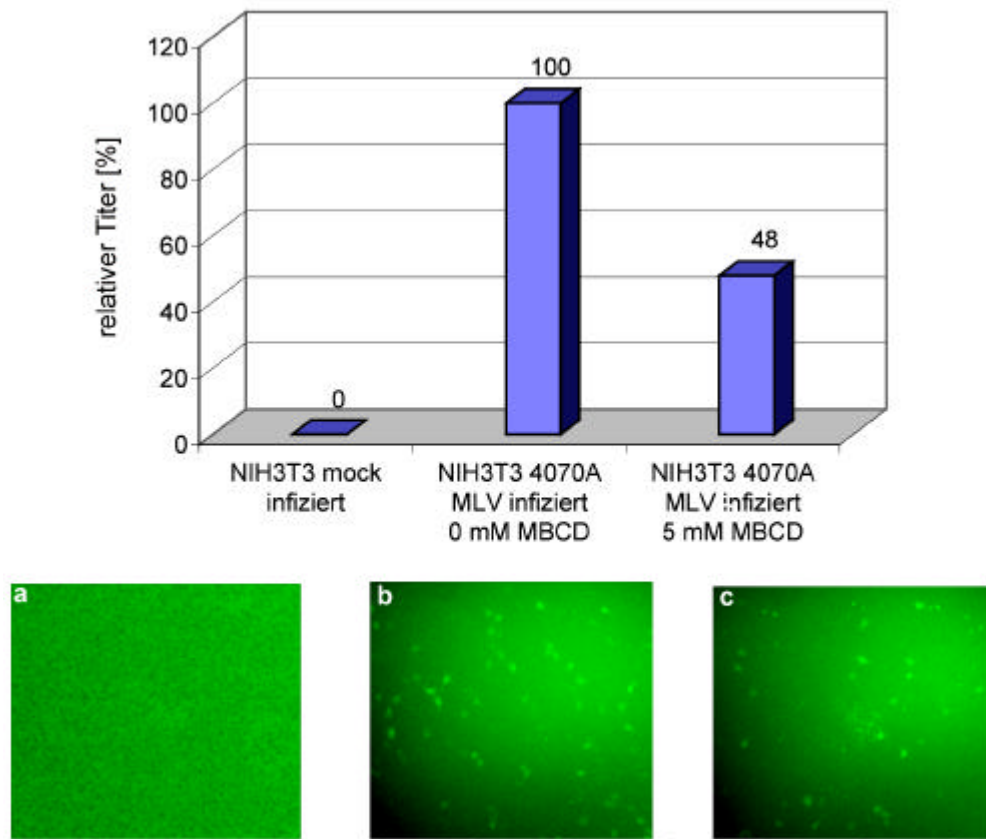


Abb. 3.22: Einfluß der Rafts und Caveolae auf die Infektion von NIH3T3 mit 4070A MLV. a) mock infizierte NIH3T3; b) 4070A MLV infizierte NIH3T3 ohne MBCD-Behandlung; c) 4070A MLV infizierte NIH3T3 mit MBCD-Behandlung; Die NIH3T3 wurden vor der Infektion mit 4070A MLV (produziert von NIH3T3) 1 Stunde mit 5 mM MBCD behandelt. Der virushaltige Überstand wurde filtriert, 1:100 verdünnt, mit 8 µg/ml Polybrene versetzt und auf die Indikatorzelllinie NIH3T3 gegeben. 48 Stunden nach der Infektion erfolgten die FACS-Analysen der infizierten gfp-positiven NIH3T3 und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Originalvergrößerung 100×

Ein weiterer Abschnitt im Lebenszyklus von 4070A MLV, an dem die zelluläre Plasmamembran entscheidend beteiligt ist, ist der Zusammenbau und die nachfolgende Freisetzung der viralen Partikel. Für andere Retroviren, wie z.B. das HIV-1, konnte gezeigt werden, daß diese Prozesse vermutlich bevorzugt im Bereich der Rafts und Caveolae stattfinden [81]. Grundlage dieser Vermutungen ist die Assoziierung von viralen Proteinen, wie dem Envelope-Protein, mit diesen cholesterinreichen Mikrodomänen. Für die Untersuchungen der Assoziierung macht man sich die Eigenschaft der Rafts und Caveolae zunutze, bei Temperaturen von 4°C nicht in Detergenzien wie Triton X-100 löslich zu sein. Alle Proteine, die sich innerhalb dieser cholesterinreichen Strukturen befinden, werden ebenfalls nicht gelöst, während alle ande-

ren Bestandteile der Plasmamembran und der Zelle in Lösung gehen. Aufgrund ihres hohen Gehalts an Lipiden reichern sich die Rafts und Caveolae im Dichtegradienten in Bereichen mit geringen Dichten an [53]. Größere, Triton X-100 unlösliche Membranbestandteile befinden sich im Pellet des Gradienten. Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen auf ihren Cholesterin- und Proteingehalt ermöglicht die Identifizierung raftassoziierter Proteine.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Raft- bzw. Caveolae-Assoziation der Envelope-Proteine näher untersucht werden, um einen Hinweis für ein mögliches Budding aus diesen Regionen der Plasmamembran zu erhalten (s. Abb. 3.23).

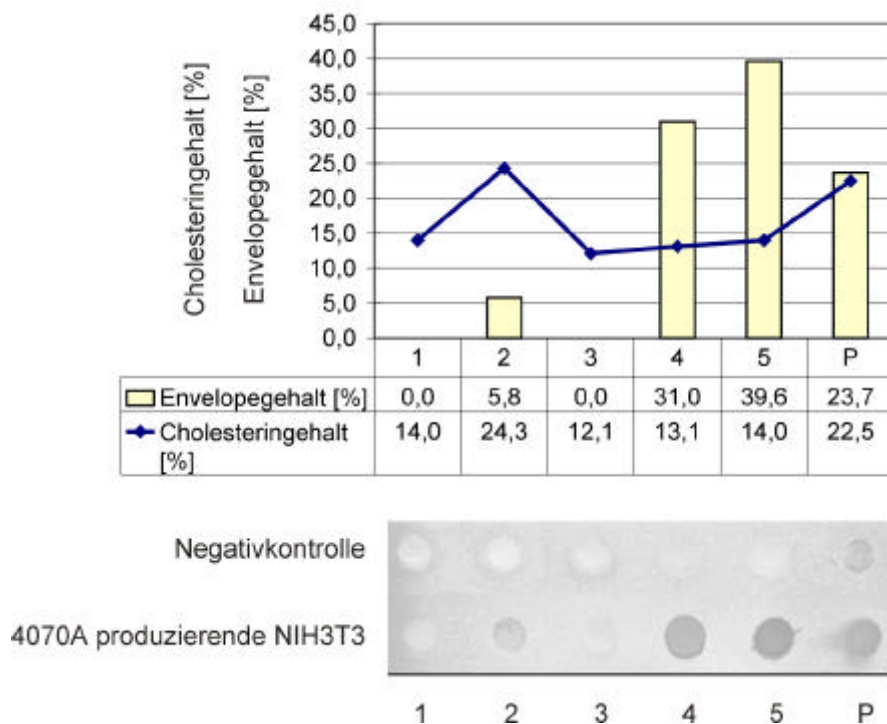


Abb. 3.23: Assoziation der 4070A MLV Envelope-Proteine in Rafts und Caveolae. 4070A MLV produzierende NIH3T3 und mock transfizierte NIH3T3 (Negativkontrolle) wurden mit 1% Triton X-100 bei 4°C behandelt und die Zellsuspension mit 60%iger Saccharoselösung auf 40% Saccharosegehalt eingestellt. 1,5 ml der Zellsuspension wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit je 1,5 ml 30%iger und 5%iger Saccharoselösung überschichtet. Der Dichtegradient wurde bei 38000 upm im SW40Ti Rotor über Nacht zentrifugiert und anschließend 1 ml Fraktionen von oben (1 bis 5) aus dem Röhrchen entnommen. Von einem Aliquot wurde enzymatisch der Cholesteringehalt bestimmt. Die Bestimmung des Gehalts an Envelope-Proteinen in den jeweiligen Fraktionen und in dem Pellet erfolgte über Dot Blot Analysen. Der prozentuale Anteil an Cholesterin und Envelope-Proteinen am Gesamtgehalt ist im Diagramm dargestellt. (P – Pellet, Fraktion 1 – geringste Dichte, Fraktion 5 – höchste Dichte)

Dazu wurden NIH3T3 mit 1% Triton X-100 behandelt und die Zellsuspension auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (40% bis 5% Saccharose) aufgetragen. Nach der Zentrifugation wurden 1 ml Fraktionen abgenommen und von diesen sowie dem unlöslichen Pellet der Gehalt an Cholesterin und Envelope-Proteinen bestimmt (siehe Abbildung 3.23). Circa 30% der Envelope-Proteine sind in den Fraktionen mit einer erhöhten Cholesterinkonzentration lokalisiert. Dieses Ergebnis läßt auf eine Raft- oder Caveolae Assoziierung dieser viralen Proteine schließen.

Rafts und Caveolae und die in ihnen vorhandenen Proteine können durch die Behandlung mit Triton X-100 bei 37°C in Lösung gebracht werden. Proteine, die mit diesen Strukturen assoziiert sind, können demnach mit einer Triton X-100 Behandlung bei 4°C im unlöslichen Pellet und bei 37°C dagegen gelöst im Überstand nachgewiesen werden (s. Abb. 3.24).

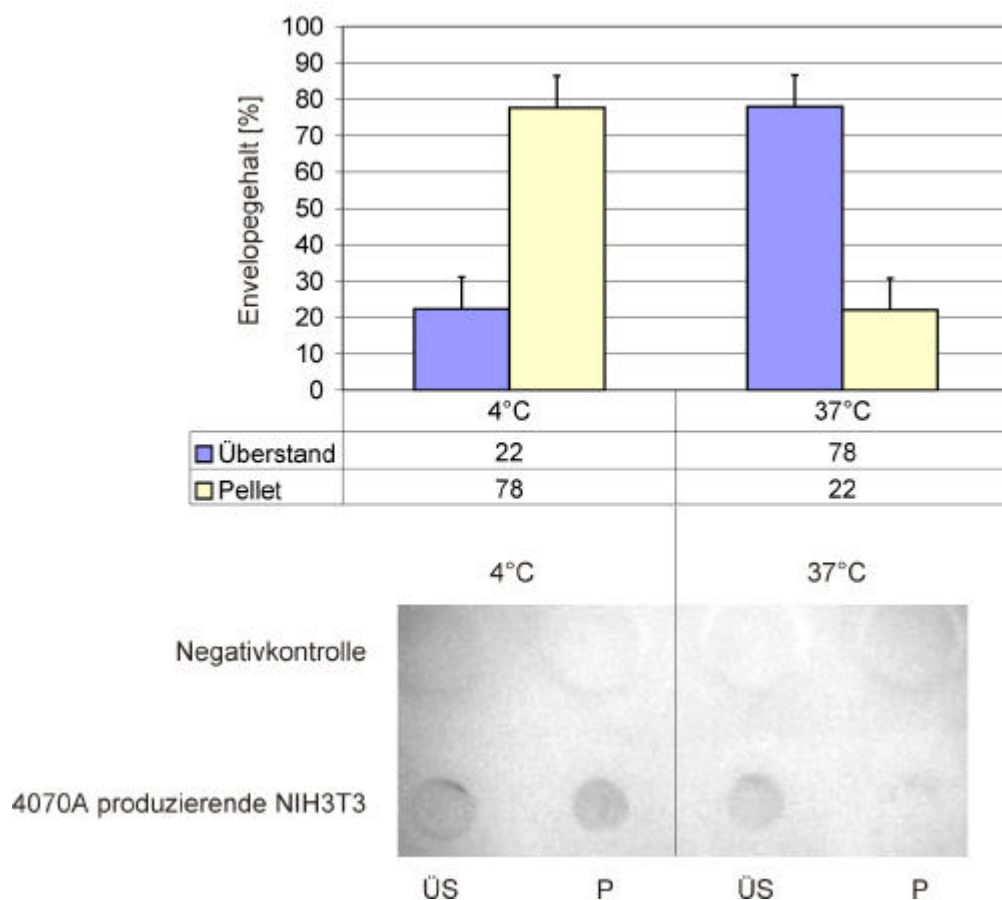


Abb. 3.24: Untersuchungen zur Assoziierung der 4070A MLV Envelope-Proteine in Rafts und Caveolae. 4070A MLV produzierende NIH3T3 und mock transfizierte NIH3T3 (Negativkontrolle) wurden mit 1% Triton X-100 bei 4°C und 37°C behandelt. Der Gehalt an Envelope-Proteinen im Überstand und im Pellet erfolgte über Dot Blot Analysen. Der prozentuale Anteil an Envelope-Proteinen am Gesamtgehalt ist im Diagramm dargestellt. Gezeigt sind die Daten aus zwei unabhängigen Versuchen. (P – Pellet, ÜS - Überstand)

Für die Envelope-Proteine der 4070A MLV produzierenden NIH3T3 konnte dieses temperaturabhängige Lösungsverhalten in Triton X-100 gezeigt werden (s. Abb. 3.24). Während bei 4°C der Großteil der Envelope-Proteine im unlöslichen Pellet zu finden ist, kehrt sich dieses Verhältnis bei 37°C um und der größte Teil befindet sich gelöst im Überstand. Mit diesem Experiment konnte die Raftassoziiierung dieser viralen Proteine bestätigt werden.

Caveolin 1 ist ein essentieller Bestandteil der Caveolae, das sich vermutlich in die Rafts einlagert, bevor es zur Ausbildung der Caveolae kommt [51]. Sind die Rafts bzw. Caveolae an dem Freisetzungsprozeß der 4070A MLV beteiligt, sollte sich dies durch das Vorhandensein von Caveolin in den viralen Membranen nachweisen lassen.

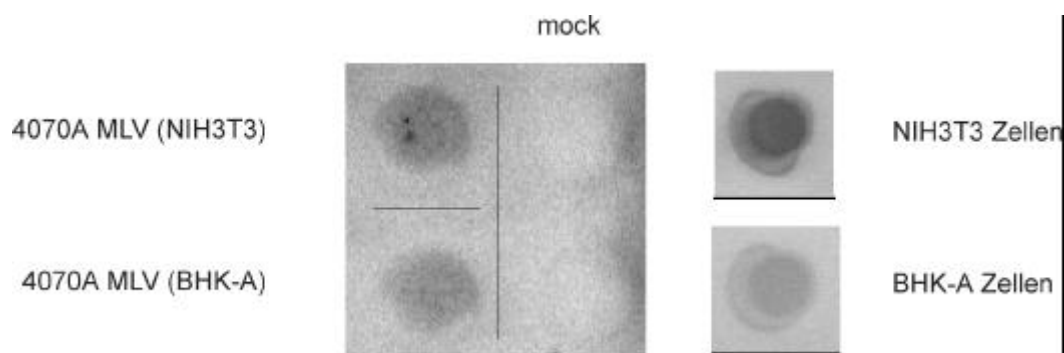


Abb. 3.25: Nachweis von Caveolin in 4070A MLV und NIH3T3 und BHK-A Zellen. 1×10^6 NIH3T3- und BHK-A-Zellen wurden pelletiert, aufgeschlossen und in PBS aufgenommen. 8 ml 4070A MLV haltiger Überstand von NIH3T3 und BHK-A wurden pelletiert und in $1 \times$ PBS aufgenommen. Die Proben wurden für die Dot Blot Analyse eingesetzt und Caveolin 1 nachgewiesen. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers für Caveolin 1 wurde in einem Western Blot überprüft (Daten nicht gezeigt).

Dazu wurden 4070A MLV (produziert von NIH3T3 und BHK-A) pelletiert und mit den Viren eine Dot Blot Analyse zum Nachweis von Caveolin durchgeführt. Parallel wurden auch NIH3T3 und BHK-A Zellen auf die Anwesenheit von Caveolin überprüft (siehe Abbildung 3.25). Sowohl in den Zelllinien als auch in den von ihnen produzierten Retroviren ließ sich Caveolin nachweisen. Daß es sich dabei um sekretierte Caveolin-haltige Vesikel handelte, konnte durch die Negativkontrolle (mock transfizierte NIH3T3) ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Beteiligung der Rafts und Caveolae an viralen Prozessen von 4070A MLV nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigen, daß die 4070A MLV bevorzugt aus den Rafts bzw. Caveolae freigesetzt werden und dort vermutlich auch der Zusammenbau der viralen Partikel stattfindet. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß für eine effiziente Infektion der Wirtszelle durch diese Retroviren das Vorhandensein von Rafts und Caveolae notwendig ist.

3.2.3 EINFLUß DER VIRUSBILDUNG AUF DIE PRODUKTIONSZELLE

Bei der Bildung von Viren durch die Wirtszelle wird der zelluläre Metabolismus durch das Virus dominiert. Dadurch kommt es zu Änderungen in der Transkription und der Translation von zellulären Proteinen [124, 148]. Für das amphotrope 4070A MLV sind bis jetzt keine Untersuchungen durchgeführt worden, wie sich die Produktion der Viren auf die Expression der zellulären Gene auswirkt. Dies sollte durch die Analyse der Genexpressionsmuster über Microarrays von NIH3T3-Produktionszellen im Vergleich zu nichtproduzierenden Zellen geklärt werden.

Die Auflistung der unterschiedlichen Genfamilien macht deutlich, daß die Virusproduktion wie vermutet bei der Produktionszelle eine Reihe zellulärer Funktionen beeinflußt (siehe Tabelle 3.6). Einige der Gengruppen waren aufgrund des Lebenszyklus der 4070A MLV erwartet worden. Dazu gehörten die Gene, die die Apoptose, die Transkription und Translation, aber auch die Immunantwort modulieren. Auffällig war die Regulation einer großen Anzahl an Genen, die Bestandteil des Cytoskeletts oder der Intermediärfilamente der Zelle sind, wie z.B. Desmin und Vimentin.

Tab. 3.6: Einfluß der Bildung von MLV-A auf die Genexpression der Produktionszelllinie

NIH3T3 (mock transfiziert und 4070A MLV produzierend) wurden für 24 Stunden bei 37°C kultiviert, anschließend die zelluläre RNA isoliert und mit genspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben. Die radioaktiv markierte cDNA wurde auf dem Atlas Mouse 1.2 Array II (Clontech) hybridisiert und die Signale mit einem PhosphorImager ausgewertet.

Gene mit Funktion bei:	durch Virusproduktion induzierte Änderung der Genexpression
Apoptose	5
Cholesterinmetabolismus	1
Cytoskelett	15
Endo- und Exocytose	2
Fettsäuremetabolismus	4
Immunantwort	8
Proteasen	5
Proteinfaltung und -zusammenbau	1
Transport und Metabolismus von RNA	3
Signaltransduktion	7
Stoffwechsel der Zelle	15
Transkription	4
Translation	6
Tumorentwicklung	5
Zellzyklus/Zellteilung	7

Die Expression von Desmin, einem Bestandteil der Intermediärfilamente, ist in virusproduzierenden NIH3T3-Zellen bis zu 180-fach hochreguliert (siehe Abbildung 3.26). Aufgrund dieser ungewöhnlich starken Regulation erfolgte eine weitere Untersuchung mit Hilfe von Western Blots, um zu überprüfen, ob sich die verstärkte Expression auch auf Proteinebene nachweisen läßt (s. Abb. 3.26). Dazu wurden NIH3T3 (mock transfiziert und 4070A produzierend) aufgeschlossen und auf den Desmingehalt untersucht. Die Quantifizierung der detektierten Desminproteine aus drei unabhängigen Versuchen ergab eine geringe, aber reproduzierbare Erhöhung des Desmingehaltes in 4070A MLV produzierenden NIH3T3 um Faktor 2,4 (Daten nicht gezeigt). Die vergleichsweise geringe Erhöhung des Gehaltes an Desminproteinen im Vergleich zum Anstieg der Desmin-mRNA deutet auf eine Regulation der Translation des

Desmins hin. Wie die offensichtliche Regulierung der Translation erfolgt, ist zur Zeit noch unklar.

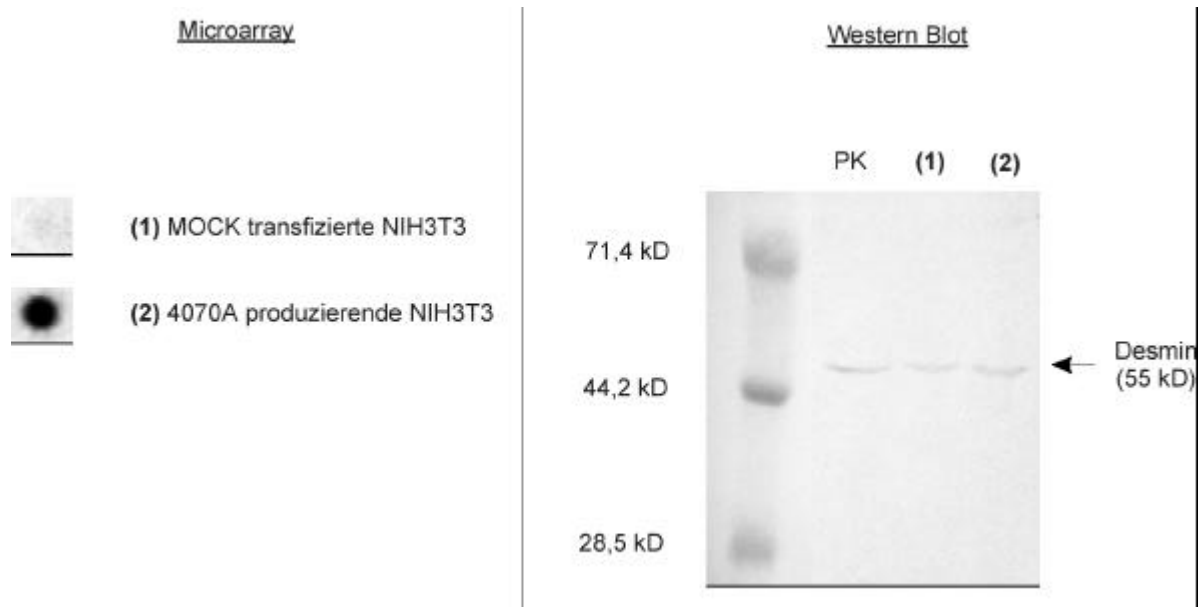


Abb. 3.26: Regulation der Desminexpression auf Transkriptions- und Translationsebene, NIH3T3 (mock transfiziert und 4070A MLV's produzierend) wurden bei 37°C kultiviert, anschließend die zelluläre RNA isoliert und diese mit genspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben. Die radioaktiv markierte cDNA wurde auf dem Atlas Mouse 1.2 Array II (Clontech) hybridisiert und die Signale mit einem PhosphorImager ausgewertet. Die Proteine von NIH3T3 (mock transfiziert und 4070A MLV's produzierend) wurden auf ein 12%iges Proteingel aufgetragen, aufgetrennt und anschließend im Western Blot der Desmingehalt analysiert. (PK – Positivkontrolle, 8 µg rekombinantes Desmin 55 kD; (1) NIH3T3 mock transfiziert; (2) NIH3T3 4070A MLV's produzierend)

Die starke Erhöhung der Genexpression des Desmingens warf die Frage auf, welche Bedeutung dieser Bestandteil der Intermediärfilamente für die Bildung von 4070A MLV haben könnte. Für Viren, wie z.B. HIV, ist die Beteiligung des Cytoskeletts und der Intermediärfilamente am Lebenszyklus der Viren beschrieben [93]. Desweiteren ist die virale Protease von HIV in der Lage, Proteine der Intermediärfilamente wie Desmin und Vimentin zu spalten, wodurch es zu einer abnormalen Verteilung der Vimentin Intermediärfilamente kommt [94]. Die Desmin Intermediärfilamente von NIH3T3 wurden über immunhistochemische Färbungen detektiert und die Präparate mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes auf eine Umstrukturierung untersucht.

Die Aufnahmen zeigen beispielhaft typische mock transfizierte NIH3T3 und 4070A produzierende NIH3T3 Zellen, die deutlich eine veränderte Struktur der Desmin Intermediärfilamente aufweisen (siehe Abbildung 3.27).

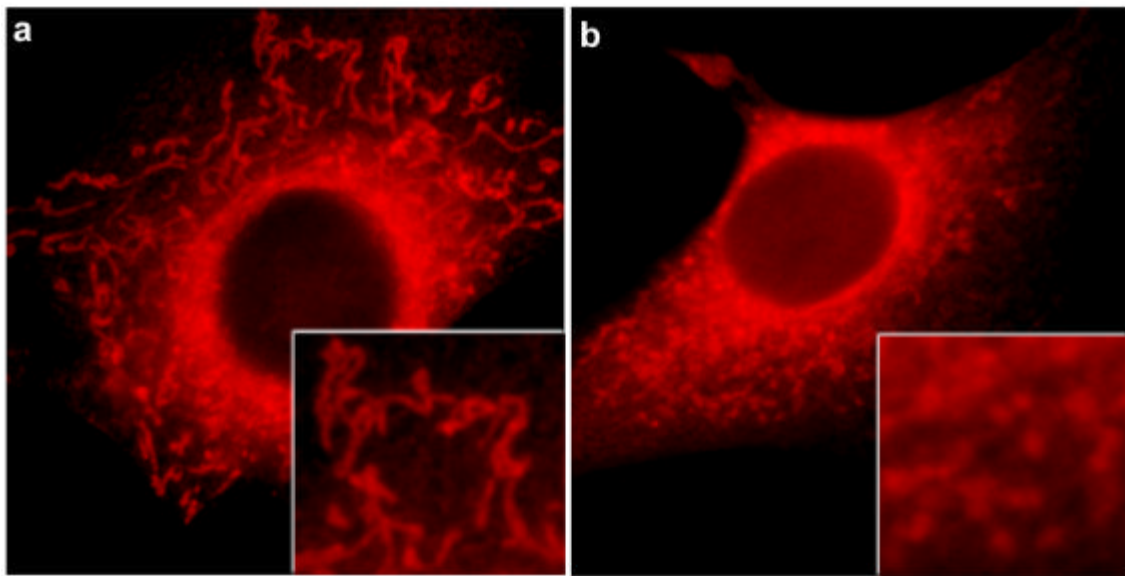


Abb. 3.27: Durch Produktion von 4070A MLV hervorgerufene Umstrukturierung von Desmin Intermediärfilamenten in NIH3T3. a) NIH3T3 mock transfiziert; b) 4070A MLV produzierende NIH3T3; Die NIH3T3 Zellen (mock transfiziert und 4070A MLV's produzierend) wurden in Chamber-Slides ausgesät, fixiert und die Desmin Intermediärfilamente mit Hilfe eines Texas Rot markierten Erstantikörpers angefärbt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Originalvergrößerung 1000×

Neben veränderten Strukturen der zellulären Intermediärfilamente werden durch die Virusproduktion zum Teil auch ganze Signaltransduktionswege, wie z.B. der Hedgehog-Signalweg, beeinflusst. Hedgehog ist bei *Drosophila* entscheidend an der Embryonalentwicklung beteiligt und das eukaryotische Homolog wird mit der Ausbildung von Tumoren in Verbindung gebracht. Ersten Untersuchungen an NIH3T3-Zellen (mock- und 4070A MLV infiziert) zufolge scheint dieser Signalweg nach Infektion mit den Retroviren herunterreguliert zu sein (Daten nicht gezeigt) und wären ein weiteres Beispiel für die Komplexität der Interaktionen von Virus und Wirtszelle. Weitere Untersuchungen dazu werden zur Zeit durchgeführt.

4 DISKUSSION

Für viele genetisch bedingte Krankheiten stehen bis heute keine wirkungsvollen konventionellen Therapien zur Verfügung. Eine Alternative ist die Gentherapie. Aufgrund des beträchtlichen Potentials dieser Behandlungsmethode wird für ihre Etablierung intensive Forschungsarbeit geleistet.

Ziel der Gentherapie ist es, fehlerhafte Gene durch eine funktionierende Kopie zu ersetzen und so die Ausbildung der Krankheitsbilder zu verhindern. Eine Möglichkeit, Zellen dauerhaft mit einem therapeutischen Gen zu versehen, ist die Verwendung von retroviralen Vektoren für den Gentransfer. Aufgrund des häufigen Einsatzes bei klinischen Phase II Versuchen werden große Mengen an rekombinanten Retroviren benötigt. Dem steht jedoch eine relativ geringe Bildungsrate der Viren gegenüber [2, 24, 25]. Die Optimierung der Produktionsbedingungen von retroviralen Vektoren ist deshalb das Thema einer Reihe von Forschungsarbeiten [2, 26, 27, 32, 33, 108]. Ein Ziel dieser Untersuchungen war die Erhöhung der retroviralen Titer durch Änderung der Kultivierungsbedingungen. In vielen dieser Arbeiten wird eine Reduktion der Kultivierungstemperatur auf 32°C empfohlen, da es aufgrund der höheren Stabilität der Retroviren bei 32°C zu einer 2 bis 20 fachen Akkumulation der Retroviren im Zellkulturüberstand kommt [26, 27, 33, 108]. Aber nicht in jedem Fall führt die Senkung der Temperatur auch zu einer Erhöhung der viralen Titer [32, 139]. In diesem Stadium der Forschung sind wirkliche Verbesserungen nur noch zu erreichen, wenn man die wechselseitigen Einflüsse von Virus und Wirt genauer analysiert, z.B. mit Hilfe von Microarray-Systemen.

In diesen früheren Untersuchungen wurden die Interaktionen von Retrovirus und Produktionszellen nicht berücksichtigt. Mit Hilfe von Microarray-Analysen konnte nachgewiesen werden, daß die Interaktionen zwischen Zelle und Virus äußerst komplex sind und die Bildung der Viren einen weitreichenden Einfluß auf verschiedenste zelluläre Prozesse, wie die Signaltransduktion und die Ausbildung von Intermediärfilamenten hat. Die Analysen beschränkten sich weiterhin auf die Prüfung der Produktivität und Vitalität der Zellen bei 32°C und die Stabilität der Viren während einer Lagerung, mögliche Auswirkungen auf die Viren wurden nicht berücksichtigt. Es ist jedoch bekannt, daß Zellen auf die Änderung der Umgebungstemperatur mit einer veränderten Lipidzusammensetzung der zellulären Plasmamembran reagieren [140]. Es war zu vermuten, daß die Kultivierungstemperatur von 32°C eine Modifikation der Membranzusammensetzung der Produktionszellen bewirkt, was sich auf-

grund der engen Interaktion von Produktionszelle und Virus auch auf die gebildeten Retroviren auswirken könnte.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß der Produktionstemperatur auf die thermische Stabilität von 4070A MLV's eingehender untersucht. Die Analysen ergaben, daß sich durch die Produktion bei 32°C die Halbwertszeit der Viren um bis zu Faktor drei reduzierte. Es konnte anschließend nachgewiesen werden, daß die Senkung der Kultivierungstemperatur von 37°C auf 32°C zu einer Erhöhung des Cholesteringehaltes der zellulären Plasmamembran sowie der viralen Membran führt und dies die Ursache für die deutliche Reduktion der thermischen Stabilität von 4070A MLV darstellt. Ein weiterer entscheidender Einfluß auf die viralen Stabilitätseigenschaften konnte der verwendeten Produktionszellinie zugewiesen werden, deren Ursache wiederum im Cholesteringehalt der Plasmamembran der Zellen liegt. Einerseits konnte gezeigt werden, daß die thermische Stabilität der gebildeten Retroviren mit der Cholesterinkonzentration der Plasmamembran der Zelle korreliert. Andererseits beeinflußt die Art der Produktionszellinie entscheidend die Qualität der Virusproduktion, d.h. das Verhältnis von infektiösen Viren zu physischen viralen Gesamtpartikeln. Cholesterin spielt aber auch beim Zusammenbau- und Freisetzungs- sowie dem Infektionsprozeß des 4070A MLV eine entscheidende Rolle. Für dieses Retrovirus konnte erstmals gezeigt werden, daß an den erwähnten viralen Prozessen die cholesterinreichen Mikrodomänen der Plasmamembran der Produktionszellen, die Rafts und Caveolae, beteiligt sind.

4.1 DIE PRODUKTION VON 4070A MLV IST ABHÄNGIG VON DER PRODUKTIONSZELLINIE

Für die Produktion von retroviralen Vektoren werden vorwiegend Zelllinien humanen und murinen Ursprungs verwendet [96-99]. Die Auswahl der Zelllinie erfolgt dabei meist nach Gesichtspunkten wie z.B. Stabilität der rekombinanten Viren in humanem Serum und Höhe der viralen Titer.

Es ist bekannt, daß die Zelllinie einen Einfluß auf die Anzahl der gebildeten infektiösen Retroviren hat [2, 104]. Eine Beobachtung, die auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Die Höhe der retroviralen Titer ist entscheidend von der Art der Produktionszelllinie abhängig. Murine NIH3T3 Zellen produzierten 1000 bis 7500 mal mehr infektiöse 4070A MLV's als die Hamsterzelllinien BHK-A und BHK21B. Interessanterweise lassen sich diese Unterschiede nicht durch eine geringere Produktivität an physischen viralen Partikeln erklären, da diese nur fünfmal niedriger sind als bei NIH3T3. Der Anteil infektiöser Viren an der Gesamtpartikelzahl nimmt in der folgenden Reihenfolge der Zelllinien ab: NIH3T3 > TE FlyA7 > BHK-A > BHK21B. Während bei NIH3T3 und TE FlyA7 circa 1% der gebildeten Viren infektiös war, lag der Anteil bei BHK21B bei 0,005%.

Das Vorhandensein nicht-infektiöser Viren ist auch bei konventionellen Verpackungszelllinien ein bekanntes Phänomen. Bei der 4070A MLV produzierenden TE FlyA-Verpackungszelllinie sind circa 1 bis 10% aller gebildeten cDNA-haltigen viralen Partikel infektiöse Viren [84]. Bei anderen MLV-Präparationen lag der Anteil der nicht-infektiösen MLV's an der Gesamtpartikelzahl bei 99 bis 99,5% [149]. Dafür gibt es mehrere Erklärungen. Zum einen enthalten retrovirushaltige Zellkulturüberstände aufgrund der viralen Instabilität immer einen mehr oder weniger hohen Anteil deaktivierter Viren. Zum anderen kommt es in Abwesenheit von für die Infektion essentiellen viralen Bestandteilen zum Zusammenbau nicht-infektiöser Partikel. So werden auch beim völligen Fehlen von Envelope-Proteinen virale Partikel produziert, die aber erst durch den Zusatz von Reagenzien wie Lipofectin infektiös werden [92]. Um die Ursache für die hohe Prozentzahl nicht-infektiöser Viren zu ermitteln, wurde der Envelopegehalt von 4070A MLV's analysiert. So ließen sich auf BHK-A produzierten Partikeln im Vergleich zu NIH3T3 zwar nur die Hälfte an Envelope-Proteinen pro Virus nachweisen, aber da bereits geringste Mengen an Envelope-Proteinen für eine erfolgreiche Infektion ausreichend sind

[105], konnte dies als Grund für den überdurchschnittlich hohen Anteil nicht-infektiöser Viren ausgeschlossen werden. In Bindungsstudien konnte weiterhin gezeigt werden, daß die 4070A Partikel aus BHK-A ebenso wie die aus NIH3T3 in der Lage sind, an die Wirtszelllinie NIH3T3 zu binden. Offenbar wird der Infektionsprozeß zu einem späteren Zeitpunkt unterbrochen. Deshalb sind die geringen Titer auch nicht durch die vermehrte Anwesenheit von Inhibitoren wie Proteoglykanen zu erklären, da diese die Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle behindern [36, 37]. Daß die Abwesenheit von viraler RNA oder der reversen Transkriptase eine Rolle spielt, konnte durch weitere Analysen ausgeschlossen werden. Eine erhöhte Deaktivierungsrate als Ursache für die große Konzentration an nicht-infektiösen Viren kommt ebenfalls nicht in Frage, da die von den BHK-Zelllinien gebildeten 4070A MLV's thermisch stabiler sind als NIH3T3 produzierte MLV's.

Über die Ursache für die Produktion der hohen Zahl an nicht-infektiösen viralen Partikeln durch die Hamsterzelllinien BHK-A und BHK21B kann zur Zeit nur spekuliert werden. Denkbar sind konformelle Änderungen der Envelope-Proteine, die durch Western Blot Analysen nicht nachweisbar waren oder eine herabgesetzte Fusiogenität der Viren. Die Lösung dieses Problems würde den effizienten Einsatz von BHK basierten Verpackungszellen und die Produktion serum- und thermisch stabiler Retroviren in einem biotechnologisch bereits gut charakterisierten Zellsystem ermöglichen [100-102].

4.2 ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG

UMHÜLLTER VIREN

Die Quantifizierung viraler Gesamtpartikel ist im Vergleich zur Bestimmung der Anzahl infektiöser viraler Partikel relativ aufwendig. Der Nachweis von retroviralen Partikeln in Zellkulturüberständen wird zum einen eingesetzt, um eine mögliche Kontamination mit Retroviren auszuschließen, und zum anderen, um die Quantität und Qualität der Virusproduktion durch Verpackungszellen zu überprüfen. Eine Kontamination mit Retroviren wird zumeist über die RT-Aktivität im Überstand nachgewiesen [85, 106]. Für die Quantifizierung der Produktion viraler Gesamtpartikel stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Neben der erwähnten Aktivität der reversen Transkriptase werden die Bestimmung der viralen strong-stop

cDNA, elektronenmikroskopische Untersuchungen und immunhistochemische Färbungen der Envelope-Proteine auf der Virusoberfläche für eine Quantifizierung der Gesamtpartikel eingesetzt [7, 84, 85, 103].

Jede der erwähnten Methoden weist Vor- und Nachteile auf. So ist der Nachweis der RT-Aktivität und der cDNA geeignet, um eine große Probenzahl zu untersuchen, hat jedoch den Nachteil, daß sie nur einen ungefähren Anhaltspunkt für die Anzahl der gebildeten Viren bietet. Dabei wird z.B. davon ausgegangen, daß 1% der infektiösen Retroviren strong-stop cDNA enthält, unabhängig von der Zelllinie und den Produktionsbedingungen. Die mit dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen zeigen jedoch, daß je nach Art der Produktionszelllinie der Anteil von infektiösen Viren an den cDNA-haltigen Partikeln unterschiedlich hoch ist. Für NIH3T3 konnte in mehreren Experimenten nachgewiesen werden, daß in etwa der Hälfte der infektiösen Partikel die strong-stop cDNA enthalten ist. Dies widerspricht den Daten anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, daß circa 1% der Gesamtpartikel infektiös sind [84, 149]. Für eine exakte Quantifizierung der viralen Gesamtpartikel mit dieser Methode ist es somit notwendig, einen zelltypspezifischen Faktor zu berücksichtigen. Dieser ist jedoch nur mit Methoden zu bestimmen, die alle viralen Partikel erfassen können.

Dazu zählen elektronenmikroskopische Untersuchungen von virushaltigen Überständen, die den Vorteil des direkten Nachweises der Retroviren bieten, aber mit einem nicht unerheblichen Geräte- und Materialaufwand verbunden sind. Immunhistochemische Färbungen sind dagegen relativ schnell und einfach durchzuführen, erfordern aber z.T. einen erheblichen Aufwand bei der Optimierung der Färbungen und sind auf die Existenz eines entsprechenden Antikörpers gegen virale Oberflächenproteine angewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue Methode zur Quantifizierung von Viren entwickelt werden, die über eine cholesterinhaltige Membran verfügen. Es handelt sich dabei um eine antikörperunabhängige Färbung, bei der durch das Antibiotikum Filipin spezifisch die Cholesterinmoleküle der viralen Membran markiert werden. Filipin weist fluorogene Eigenschaften auf und kann mit einem Filtersatz für das bfp (‘blue fluorescence protein‘; Anregung 387 nm, Emission 450 nm) visualisiert werden. Durch diese Fluoreszenz können die Viren im Fluoreszenzmikroskop bei 1000× Vergrößerung sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung erfolgt über den direkten Vergleich mit 100 nm großen fluoreszenzmarkierten Partikeln (z.B. Texas Rot markiert), deren Konzentration bekannt ist.

Die Filipinfärbung weist einige Vorteile auf. Sie ist einfach und schnell durchführbar. Der Vergleich mit der cDNA-Messung zeigte, daß sie bis zu 40 mal sensitiver ist, sie erfordert aufgrund der Spezifität für Cholesterin keine langwierigen Optimierungen, und es sind keine virusspezifischen Antikörper erforderlich. Die viralen Partikel können mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden, und die Färbung ist für alle Viren, deren Membran Cholesterin enthält, geeignet. Im letzten Punkt liegt aber auch die Beschränkung dieser Methode. Bei zu geringem Cholesteringehalt der viralen Membran lassen sich die Viren aufgrund der zu geringen Fluoreszenz nicht erkennen (Detektionslimit ist noch nicht bekannt). Eine gewisse Signalstärke ist jedoch notwendig, da die Viren erst durch den Lichthof um den Partikel in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden. Desweiteren kann sie bei Zelllinien wie z.B. HepG2 einer humanen Hepatoma-Zelllinie, die dazu neigen eine große Anzahl von plasmamembranumhüllten Vesikeln zu entlassen, zu verfälschten Ergebnissen führen. Dort muß eine entsprechend gründliche Untersuchung von mock-infizierten bzw. transfizierten Zellen durchgeführt werden und der Hintergrund bei der Quantifizierung entsprechend berücksichtigt werden.

Mit der hier entwickelten Methode steht eine neue attraktive Möglichkeit zur Quantifizierung viraler Gesamtpartikel zur Verfügung, die das Potential hat, bestehende Nachweismethoden zu ersetzen.

4.3 DIE INAKTIVIERUNGSKINETIK VON 4070A MLV IST ABHÄNGIG VON DER LAGERUNGSTEMPERATUR

Es ist bekannt, daß die Absenkung der Temperatur während der Lagerung von Retroviren zu einer Verlangsamung der Inaktivierungsgeschwindigkeit führt [26, 27, 32, 33, 107, 108]. Die Erniedrigung der Temperatur um 5°C erhöht die Stabilität und die Halbwertszeit der Viren durchschnittlich um das Doppelte [107]. Die durchgeführten Untersuchungen konnten die Temperaturabhängigkeit der Lagerungsfähigkeit für 4070A MLV's bestätigen. Die Reduktion der Lagerungstemperatur von 20°C auf 4°C erhöhte die Halbwertszeit, in Abhängigkeit von der Produktionszelllinie, im Durchschnitt um Faktor 5.

Die Inaktivierungskinetik weist dabei meist einen sigmoidalen Verlauf auf und lässt sich in zwei Phasen einteilen. Eine sogenannte Plateauphase, in der es zu keinem meßbaren Abfall im viralen Titer kommt, und einer zweiten Phase, die den bekannten exponentiellen Verlauf von Inaktivierungskinetiken besitzt. Dieser Verlauf der Inaktivierung konnte auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden [32, 107]. Wie stark die Plateauphase ausgeprägt ist, hängt im wesentlichen von der Lagerungstemperatur und der Produktionszelllinie ab. Generell gilt aber, daß diese Phase, unabhängig von der Zelllinie, bei 4°C prägnanter ist als bei 20°C. Warum die Viren erst relativ stabil sind und was dann die schnelle Inaktivierung verursacht, ist nicht bekannt. Möglicherweise kommt es zu Änderungen in der viralen Membran, die eine Fusion mit der Wirtszelle verhindern, zur Degradation der Envelope-Proteine oder zur Oxidation der Lipide der Membran. Letzteres führt zur Zerstörung von Membranen und ist für Influenza Viren als Grund für die Inaktivierung der Viren bei einer Lagerung beschrieben [112, 113]. Da die Lipidoxidation eine Kettenreaktion ist, könnte dies die schnelle Inaktivierung erklären. Eine weiterführende Diskussion der Lipidoxidation im Zusammenhang mit der viralen Instabilität erfolgt in Abschnitt 4.5.

4.4 DIE PRODUKTIONSTEMPERATUR BEEINFLUßT DIE STABILITÄT VON 4070A MLV

Das Hauptaugenmerk vieler Untersuchungen von Verpackungszelllinien liegt auf einer höchstmöglichen Produktion von infektiösen retroviralen Partikeln. Eine scheinbar einfache Methode, eine Erhöhung der viralen Titer zu erreichen, ist die Absenkung der Produktionstemperatur von 37°C auf 32°C [26, 27, 32, 33]. Die Produktionsrate der Viren ist nur wenig von der Temperatur abhängig und wird lediglich um 10% reduziert, dagegen erhöht sich die Halbwertszeit der Retroviren durch die geringere Temperatur auf das Doppelte [107]. Dies hat zur Folge, daß es zur verstärkten Akkumulation der Viren kommt und sich die Titer erhöhen. Allerdings ist diese Möglichkeit zur Erzielung höherer Titer nicht unumstritten. So konnte Forestell et al. keine Erhöhung der viralen Titer feststellen und andere Autoren empfehlen die Produktion bei 37°C [32, 139].

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte die Verbesserung der Produktion von infektiösen

4070A MLV nicht bestätigt werden. Die viralen Titer der 32°C-Produktion lagen bei allen untersuchten Zelllinien unter denen einer 37°C Produktion. Möglicherweise hängt es von der Produktionszelllinie und der Art (Fermenter oder Zellkulturflasche) und Dauer der Produktion ab, ob es zu einer effektiven Akkumulation der Viren im Zellkulturüberstand kommt.

Neben der fraglichen Steigerung des Endpunkttiters zeigte sich, daß die herabgesetzte Temperatur zur Reduktion der Stabilität der 4070A MLV's führt. Die veränderte Temperatur von 32°C reduziert die Halbwertszeiten der Retroviren in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie um das zwei bis dreifache. Diese scheinbar geringe, aber statistisch signifikante Verringerung ist für eine Produktion im Großmaßstab mit ihren langwierigen Aufarbeitungs- und Aufkonzentrierungsprozessen durchaus von höherer Relevanz. So wären bei einer Aufarbeitungsdauer von einem Tag bei 4°C die Hälfte aller Viren, die durch NIH3T3 bei 32°C gebildet wurden, allein durch ihre erhöhte Sensibilität inaktiv, während die „37°C“-Viren noch ihre vollständige Infektiösität besäßen. Diese erhöhte Instabilität schwächt den möglichen Vorteil einer Produktion bei 32°C, die erhöhte Virusakkumulation, entscheidend ab. Für Produktionen, die Aufarbeitungsprozeduren erfordern, deren Zeitaufwand im Bereich der viralen Halbwertszeiten liegen, kann deshalb eine Produktion bei 32°C nur bedingt empfohlen werden. Vor einer Produktion sollte der mögliche Einfluß auf die viralen Titer und die Stabilitätseigenschaften der Retroviren untersucht werden.

4.5 ERHÖHTE CHOLESTERINKONZENTRATION IN DER VIRALEN

MEMBRAN VERRINGERT DIE THERMISCHE STABILITÄT VON 4070A

MLV

Die durch die Absenkung der Temperatur auf 32°C verursachte Erhöhung der viralen thermischen Instabilität ist unabhängig von der verwendeten Produktionszelllinie (NIH3T3, BHK-A, BHK21B, TE FlyA7), was auf einen generellen zellulären Mechanismus hindeutet.

Eine Möglichkeit, wie die Produktionszelllinie die viralen Stabilitätseigenschaften beeinflussen könnte, ergibt sich aus dem Freisetzungsprozeß der Retroviren. Bei diesem wird die virale Membran aus der zellulären Plasmamembran gebildet. Die zelluläre Membran stellt damit die Schnittstelle zwischen Virus und Zelle dar [46]. Das heißt, daß Änderungen, die die Membran der Produktionszelle betreffen, sich auch auf den Virus auswirken könnten.

Mit Hilfe von Microarray basierten Untersuchungen wurde die Beeinflussung der Produktionszelllinie NIH3T3 durch Absenkung der Temperatur von 37°C auf 32°C analysiert. Diese Methode ist geeignet, um gleichzeitig eine Vielzahl von Genen auf die Änderung der Expressionsstärke zu untersuchen. Die Analysen ergaben ein komplexes Muster hoch- und herunterregulierter Gene, die nach ihrer Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen in Gruppen geordnet wurden. In ihrer Expression waren auch Gene verändert, die an der Biosynthese und Homöostase des Cholesterins beteiligt sind, was eine Veränderung des Cholesterinspiegels in den Zellen vermuten ließ. In weiterführenden Analysen konnte gezeigt werden, daß es aufgrund der Absenkung der Temperatur zur Erhöhung des Cholesteringehaltes in der Plasmamembran kommt, was zur Folge hat, daß auch in den 4070A MLV's die Cholesterinkonzentration zunimmt. Der Vergleich von Cholesteringehalt der Zellen und der thermischen Stabilität der von ihnen gebildeten Retroviren deutete auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Cholesterinkonzentration der viralen Membran und den viralen Stabilitätseigenschaften. Durch die *in vitro* Depletion von Cholesterin aus den viralen Membranen mit Hilfe von Methyl- β -Cyclodextrin konnte die thermische Stabilität der Viren um das vier- bis zwölf-fache erhöht und somit nachgewiesen werden, daß die Cholesterinkonzentration und die Geschwindigkeit der viralen Inaktivierung in direktem Zusammenhang stehen.

Cholesterin ist ein wesentlicher Bestandteil biologischer Membranen, der ihre Fluidität und Permeabilität beeinflußt. Die Erhöhung der Cholesterinkonzentration verringert die Fluidität von Membranen [47]. Da niedrigere Temperaturen die Plasmamembran unbeweglicher machen (einfrieren), ist es auf den ersten Blick nicht klar, warum die Zelle auf die Absenkung der Temperatur auf 32°C mit einer erhöhten Cholesterinsynthese reagiert. Sinnvoller erscheint es, daß die Synthese verringert wird, um die Membran durch weniger Cholesterin beweglicher zu machen. Aber das Cholesterin hat auch eine Funktion als sogenannter Weichmacher von Membranen, der den Übergang von der ungeordneten zur geordneten Phase verhindert. In der geordneten Phase geht die Membran in einen gelartigen kristallinen Zustand über, der den Tod der Zelle zur Folge hat. Bei einer erhöhten Cholesterinkonzentration wird die Temperatur, bei der dieser Zustand auftritt, verringert und stellt somit eine Anpassung an niedrigere Temperaturen dar. Höhere Cholesterinspiegel stabilisieren die Plasmamembran beim Abkühlen und erhöhen dadurch ihre Elastizität [110, 111]. Wechselwarme Organismen, wie z.B. Fische, können die Konzentration sogar an die Umgebungstemperatur anpassen und so möglichen Phasenübergängen der Membran entgegenwirken [109].

Durch die verringerte Fluidität der Plasmamembran bei höheren Cholesterinkonzentrationen verstärkt sich ihre mechanische Stabilität [47]. 4070A MLV's mit einem erhöhten Cholesteringehalt sollten demnach stabiler sein. Für die mechanische Stabilität trifft dies auch zu. Die Entfernung von Cholesterin aus den viralen Membranen verursacht die mechanische Instabilität der Viren, z.B. durch Zentrifugation (Daten nicht gezeigt). Die thermische Stabilität der 4070A MLV's wird jedoch durch eine vermehrte Cholesterineinlagerung deutlich herabgesetzt. Was aber verursacht die schnellere Inaktivierung der Retroviren? Untersuchungen an Influenza Viren geben eine mögliche Erklärung. Für diese Viren konnte gezeigt werden, daß die Peroxidation von Lipiden der viralen Membran der Grund für die Inaktivierung der Viren während einer Lagerung ist [112, 113]. Der Zusatz von Substanzen, die eine Oxidation beschleunigen, erhöhte die Inaktivierungsrate, während Antioxidantien zur Stabilisierung der viralen Aktivität führten. Es wird vermutet, daß der Lipidoxidation der viralen Membran die Inaktivierung des Virus folgt.

Die Peroxidation von ungesättigten Lipiden wie Cholesterin wird durch freie Radikale ausgelöst und initiiert eine Kettenreaktion. Durch diese können eine große Anzahl ungesättigter Lipide oxidiert werden. Die Lipidperoxidation und die durch sie ausgelöste Zerstörung von Membranen wird mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht [129, 130]. Dazu zählen Arteriosklerose, Diabetis, rheumatische Arthritis, Alzheimer und die Parkinson Krankheit. Die Neigung des Cholesterins zur Oxidation erhöht sich bei steigendem Cholesteringehalt der Membranen, und die Lipidperoxidation selbst wird mit der Zunahme der Membranviskosität, die mit der Instabilität von Membranvesikeln assoziiert ist, in Verbindung gebracht [131, 132]. Das Potential zur Zerstörung von Membranen beruht vermutlich auf einer erhöhten Transferrate der Lipidperoxide zwischen der exo- und cytoplasmatischen Membranseite, wie es z.B. für das Cholesterinhydroperoxid nachgewiesen wurde [133].

Das heißt, eine durch den erhöhten Cholesteringehalt ausgelöste Steigerung des oxidativen Stresses könnte die Zerstörung der viralen Membran nach sich ziehen und die Ursache für die schnellere Inaktivierung der 4070A MLV's sein. Diese Vermutung könnte wie bei den Influenza Viren durch den Einsatz von Substanzen, die eine Oxidation von Lipiden verhindern, bestätigt werden. Es sollte dann zu einer Erhöhung der Halbwertszeit der 4070A MLV's kommen.

Möglicherweise ist der unterschiedliche Cholesteringehalt der Zelllinien auch eine der Ursachen für die Beeinflussung der viralen Stabilität durch die Produktionszelllinie. NIH3T3 Zellen, die die thermisch labilsten 4070A MLV's produzieren, weisen gegenüber den anderen

Zelllinien (BHK-A, BHK21B, TE FlyA7) eine höhere Cholesterinkonzentration auf. Gleichzeitig sollten diese Viren aber mechanisch stabiler sein. Es ergaben sich Anhaltspunkte für eine höhere Resistenz gegenüber den Scherkräften, wie sie bei einer Ultrazentrifugation auftreten, als bei BHK-A produzierten Viren. Dieser Fragestellung konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter nachgegangen werden.

Je nach Art der Aufarbeitung und Lagerung ist es demnach sinnvoll, cholesterinreichere oder cholesterinärmere Viren zu produzieren. Um dies zu erreichen, wäre eine Steuerung der Cholesterinsynthese über Inhibitoren des Cholesterinbiosyntheseweges, wie z.B. Lovastatin oder Compactin (beides sind Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase), denkbar. Eine weitere Möglichkeit wäre die Produktion der Retroviren mit Zellen, deren Cholesterinsynthese ausgeschaltet wurde oder die kein bzw. wenig Cholesterin synthetisieren und deren Cholesterinkonzentration gezielt über die Gabe von freiem Cholesterin beeinflusst werden könnte.

4.6 CHOLESTERINREICHE MIKRODOMÄNEN HABEN EINE WEITREICHENDE BEDEUTUNG FÜR DEN VIRALEN LEBENSZYKLUS

Cholesterin hat als Bestandteil der zellulären Plasmamembran nicht nur einen Einfluß auf die Stabilität und Fluidität der Membran, sondern beeinflusst durch die Bildung der Rafts und Caveolae eine Vielzahl zellulärer Funktionen [47]. Dies geschieht insbesondere durch die Anreicherung von membranassoziierten Proteinen. In der letzten Zeit zeigte sich, daß nicht nur zelluläre, sondern auch virale Prozesse, wie der Zusammenbau, die Freisetzung der Viren und die Infektion der Wirtszellen von dem Vorhandensein dieser cholesterinreichen Mikrodomänen abhängig sind. Der Grund dafür liegt in der Assoziierung von viralen Proteinen und/oder Rezeptoren mit den Rafts und Caveolae. Dies wurde für verschiedene Viren (Masernvirus, Semliki Forest Virus, HIV, Influenza Virus, Moloney MLV) nachgewiesen [52, 76-81, 114]. So erfolgt z.B. die Infektion durch das ecotrope Moloney MLV über den CAT-1 Rezeptor, der in den Rafts und Caveolae lokalisiert ist [76]. Diese Untersuchungsergebnisse lassen ähnliches für das eng verwandte 4070A MLV vermuten. So wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen die Abhängigkeit des Infektionsprozesses von den Rafts und Caveolae und zum anderen die Beteiligung dieser Mikrodomänen am Zusammenbau- und Freisetzungsprozeß analysiert.

Die Beteiligung der cholesterinreichen Domänen beim Zusammenbau und der Freisetzung der 4070A MLV wird über die in ihnen lokalisierten viralen Proteine nachgewiesen. Eine wesentliche Grundlage für den Nachweis der Assoziierung von Proteinen mit den Rafts und Caveolae ist die Unlöslichkeit dieser Domänen in Triton X-100 bei 4°C [115]. Nach Zentrifugation Triton X-100 behandelter Zellen finden sich ungelöste Proteine im Pellet wieder, bei einem Dichtegradienten reichern sie sich mit den cholesterinreichen Domänen in Bereichen mit geringen Dichten an. Wird die Temperatur bei der Behandlung der Zellen allerdings auf 37°C erhöht, werden die vorher unlöslichen Proteine gelöst und sind nach der Zentrifugation vermehrt im Überstand und weniger im Pellet vorhanden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die teilweise Assoziierung von Envelope-Proteinen mit den Rafts bzw. Caveolae im Dichtegradienten gezeigt werden. So sind circa 30% der in der Zelle enthaltenen Envelope-Proteine in den cholesterinreichen Mikrodomänen lokalisiert. Der Großteil ist jedoch in den Fraktionen nachzuweisen, die nicht den Rafts und Caveolae zuzuordnen sind. Allerdings ist die Einlagerung und Aufkonzentrierung in diesen Domänen kein Prozeß, der die Proteine von anderen Membranbereichen vollständig ausschließt. So wurde für gut charakterisierte Raft-Proteine gezeigt, daß immer ein mehr oder weniger großer Anteil der Proteine auch in den cholesterinärmeren Regionen der Plasmamembran zu finden ist [77, 116]. Gleiches gilt auch für virale Envelope-Proteine. So sind bei Viren, wie dem Masernvirus und HIV, bei denen man mittlerweile von der Involvierung der Rafts bzw. Caveolae beim Zusammenbau und der Freisetzung der Viren ausgeht, 30 bis 40% der Envelope-Proteine mit den Rafts oder Caveolae assoziiert [77, 116]. Möglicherweise ist dies auf eine Sättigung der Rafts mit den entsprechenden viralen Proteinen zurückzuführen [80].

Ein Teil der Envelope-Proteine befand sich nach der Dichtezentrifugation im unlöslichen Pellet. Dieses Pellet bildete sich, da die Zellen nach der Triton X-100 Behandlung Aggregate bildeten, die nur sehr schwer zu suspendieren waren. Der, wie in den Fraktionen mit geringer Dichte, erhöhte Cholesteringehalt des Pellets wies jedoch auf das Vorhandensein der Mikrodomänen hin. Der Anteil, der in dieser Fraktion enthaltenen Envelope-Proteine wurde den Rafts und Caveolae zugeordnet, da sich die Proteine erst nach Behandlung des Pellets mit Triton X-100 bei 37°C lösten und in den Überstand übergangen.

Die oben erwähnten Ergebnisse sollten ein starker Hinweis dafür sein, daß der Zusammenbau und die Freisetzung der Viren über die Rafts und Caveolae erfolgt. Allerdings publizierten Yu et al. 1998 einen Artikel, nach dem für den Nachweis der viralen Envelope-Proteine vor allem die Bindung von sekretierten löslichen Envelope-Proteinen an den viralen Rezeptor verantwortlich ist [117]. Auf Zellen, die das Envelope-Protein exprimierten, aber über keinen adäquaten Rezeptor verfügten, konnten diese viralen Proteine erst nach Expression des Rezeptors nachgewiesen werden. Dies würde bedeuten, daß mit den oben diskutierten Ergebnissen eher die Raftassoziiierung des Rezeptors als die der Envelope-Proteine gezeigt wurde. Um diese Möglichkeit auszuschließen, müßten Versuche mit Zelllinien durchgeführt werden, die über keinen Rezeptor für 4070A MLV verfügen, wie z.B. BHK-A. Der Nachweis der gelösten und ungelösten Proteine würde dann über die sensitiveren Immunpräzipitations-Biotinylierungs-Assays erfolgen. Sind die Rafts und Caveolae die Orte des Zusammenbaus der 4070A MLV's, könnte dies auch durch die Assoziierung von gag-Proteinen (Matrix-, Kapsid, Nukleoprotein) mit diesen cholesterinreichen Mikrodomänen nachgewiesen werden. Die Untersuchungen dazu werden zur Zeit durchgeführt.

Um trotzdem einen weiteren Hinweis für die Assoziierung der Envelope-Proteine mit den Rafts bzw. Caveolae zu erhalten, wurden die viralen Partikel auf den Gehalt an Caveolin überprüft. Wenn die Freisetzung der 4070A MLV's aus den Caveolae erfolgt, sollte sich dieses in den viralen Partikeln nachweisen lassen. Dies war sowohl für NIH3T3 als auch für BHK-A produzierte Viren der Fall. Das heißt, daß die Freisetzung vermutlich in den Regionen der Caveolae stattfindet und möglicherweise sind diese cholesterinreichen Regionen auch am Zusammenbau der Viren beteiligt.

Weitere Hinweise für die Lokalisierung der Envelope-Proteine in Rafts und/oder Caveolae ergeben sich aus der Kopplung der Transmembran-Untereinheit des Envelope-Proteins von Moloney MLV mit Palmitinsäure [119]. Palmitinylierte Proteine sind meist mit den cholesterinreichen Mikrodomänen der Zelle assoziiert [120, 121]. Für Influenza Viren konnte gezeigt werden, daß die Entfernung der Palmitinylierungsstellen im Hemagglutinin (HA) zu einem Ausschluß der Proteine aus den viralen Partikeln führte [78]. Bei HIV führte der Verlust der Palmitinsäure ebenfalls zu einem verringerten Einbau der Envelope-Proteine in die viralen Partikel und reduzierte die Infektiösität der Viren um 60% [118]. Da die Erkennungsstellen für eine Kopplung mit Palmitinsäure in den Envelope-Proteinen des Moloney MLV (MoMLV) und des 4070A MLV sehr stark konserviert sind, sind vermutlich auch an diesen

Palmitinsäure gebunden und somit zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen eine Raftassoziierung sehr wahrscheinlich [119].

Für das MoMLV wurde nachgewiesen, daß sein Rezeptor (CAT-1) mit den Rafts und Caveolae assoziiert ist und die Auflösung der Struktur dieser Mikrodomänen einen deutlichen Verlust der Infizierbarkeit dieser Zellen durch den Virus nach sich zieht [76]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine ähnliche Abhängigkeit auch für den 4070A MLV gezeigt werden. Die Raft/Caveolae-Assoziierung des PIT-2 Rezeptors für diesen amphotropen Retrovirus konnte zwar in Ermangelung geeigneter Antikörper nicht nachgewiesen werden, aber die Extraktion von Cholesterin aus den Plasmamembranen der Wirtszellen führte zu einer Reduktion der Infektionsrate um 50%. Vermutlich wird durch die Zerstörung der cholesterinreichen Mikrodomänen ein früher Prozeß in der viralen Infektion, wie z.B. die Fusion mit der Membran der Wirtszelle, inhibiert [76].

Mit der vorliegenden Arbeit konnten erstmals die Rafts und Caveolae als Orte des Zusammenbaus und der Freisetzung von 4070A MLV's identifiziert werden. Möglicherweise ergeben sich dadurch neue Erkenntnisse für den bisher kaum verstandenen Prozeß des Zusammenbaus der viralen Partikel an der zellulären Plasmamembran. Gleichzeitig sind die Rafts und Caveolae auch erstmalig als die Bereiche der Membran lokalisiert worden, an denen die Infektion der Zelle durch 4070A MLV's erfolgt.

4.7 EINFLUß DER VIRUSPRODUKTION AUF DIE PRODUKTIONSZELLINIE

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie die Produktionszelle Einfluß auf die Virusbildung und einige der viralen Eigenschaften nimmt. Dabei sind Änderungen, die die zelluläre Plasmamembran als Schnittstelle zwischen Virus und Zelle betreffen, offenbar von besonderer Bedeutung. Die Wechselwirkung zwischen Virus und Zelle ist jedoch nicht einseitig. Die Infektion und die Virusproduktion führen zu vielfältigen Änderungen in den Wirts- und Produktionszellen, die man sich zum Teil in der Virusdiagnostik zunutze macht. Prominentes Beispiel ist das HIV, bei dem es zu Modifikationen in der Präsentation von Oberflächenmarkern kommt [122]. Auch bei anderen Virusarten wie dem BLV (bovine leukemia

virus) wurden nach Infektion der Zellen Änderungen im Expressionsmuster von Genen festgestellt [123].

Zur Analyse der Beeinflussung der Genexpression, die durch die Produktion von 4070A MLV verursacht wird, wurde wiederum die Microarray-Technologie eingesetzt. Aus den Untersuchungen wurde deutlich, daß die Wechselwirkungen zwischen Virus und Zelle komplexer sind als angenommen. So werden z.B. ganze Signaltransduktionswege, wie die Hedgehog-Signaltransduktionskette, herunterreguliert. Die Deregulation des Hedgehog-Signalweges führt im Mausmodell zur Bildung von Tumoren. Weiterführende Analysen dazu werden momentan durchgeführt.

Für MLV liegen für die durchgeführten Untersuchungen zur Zeit noch keine vergleichbaren Analysen vor. Durch Microarray basierte Untersuchungen von HIV-Infektionen wurde die Regulation von Genen nachgewiesen, die ebenfalls an verschiedenen zellulären Signalwegen beteiligt sind [124]. Der Vergleich der vorliegenden Daten ergibt, daß die unterschiedlichen Systeme (C-Typ Virus versus Lentivirus) vielschichtige Reaktionswege aktivieren. Sie bestätigen damit die beobachtete Komplexität der Wirtszell-Virus-Interaktionen.

Die Anwendung der Microarray Technologie bietet die Möglichkeit, solch vielschichtige Interaktionen wie zwischen Virus und Wirtszelle eingehend zu untersuchen. Dabei ergeben sich völlig neue Einblicke und Zusammenhänge. Allerdings müssen die Expressionsanalysen sorgfältig ausgewertet werden. Um Aussagen über die Regulierung von Genen auf Transkriptionsebene zu treffen, sollten für ein statistisch relevantes Ergebnis mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt werden [125]. Inwieweit diese Änderungen dann auch einen funktionellen Einfluß auf die Zellen haben, ist mit weiterführenden Analysen zu klären. Dazu zählen z.B. die Bestätigung der Ergebnisse auf RNA-Ebene (RT-PCR) sowie auf Proteinebene mit Western Blot Analysen, immunhistochemische Färbungen und entsprechende „Knock out’s“ der Gene und Inhibition der Genexpression über RNAi.

Die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersuchten Modifikationen in den Expressionsstärken der verschiedensten Gene sind jedoch ein erster Anhaltspunkt für die Vielfältigkeit und Komplexität der untersuchten Systeme und damit der Ausgangspunkt für eine Vielzahl weiterer Forschungsarbeiten.

Erste Daten bestätigen die mittels Microarrays gemachten Beobachtungen. Ein Gen, daß eine besonders auffällige Regulation zeigte, war Desmin. Dieses Protein ist bei virusproduzieren-

den im Vergleich zu mock-infizierten NIH3T3 180 fach hochreguliert. Desmin ist ein Bestandteil der Intermediärfilamente und gehört mit Vimentin und dem fibrillären sauren Glialprotein zu den Typ III Proteinen [126]. Intermediärfilamente werden den Cytoskelett-Fasern zugeordnet und sind die stabilsten Proteinfasern der Zelle. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist vermutlich die Stabilisierung der Plasmamembran bei Zell-Zell-Kontakten. Desmin wird normalerweise in allen Muskelzellen exprimiert und dient als Marker für die Muskeldifferenzierung. Warum das Gen auch in der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 angeschaltet ist, ist nicht bekannt, aber möglicherweise wurde durch die Immortalisierung der Zelllinie die Expression des Desmingens angeregt.

Mit Hilfe von Western Blot's und immunhistochemischen Färbungen wurden weitergehende Analysen, das Desminprotein betreffend, durchgeführt. Dabei konnte lediglich eine Verdopplung des Desminproteingehaltes festgestellt werden. Offenbar wird der Proteingehalt auf der Ebene der Translation kontrolliert. Wie dies geschieht, ist zur Zeit nicht bekannt. Denkbar wäre eine extrem kurze Halbwertszeit der mRNA oder aber eine aktive Translationskontrolle durch die Stabilisierung der mRNA über die Blockierung destabilisierender RNA-Bereiche durch die Bindung von Proteinen.

In den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich jedoch eine Umstrukturierung der desminhaltigen Intermediärfilamente bei virusproduzierenden NIH3T3. Die in mock-transfizierten NIH3T3 faserige Struktur der Filamente verteilt sich bei 4070A MLV produzierenden Zellen punktförmig über das Cytoplasma. Ähnliches wurde für HIV-1 und Vimentin gezeigt [94]. Die Protease von HIV-1 ist in der Lage, Proteine der Intermediärfilamente, wie z.B. Desmin, Vimentin und das fibrilläre saure Glialprotein, zu spalten. Dies führt im Fall von Vimentin zu einer Verklumpung der vorher faserigen Struktur [94]. Möglicherweise ist also die Veränderung in den Desminfasern auf die Aktivität der viralen Protease zurückzuführen. Da aber in Western Blots keine proteolytische Spaltung der Desminproteine festgestellt werden konnte, ist zur Zeit nicht klar, was diese Umstrukturierung hervorruft und ob es sich eventuell um ein methodisch bedingtes Artefakt handelt.

Desweiteren stellt sich die Frage, warum durch die Virusproduktion die Expression des Desmingens so massiv angeschaltet wird. Eine Möglichkeit wäre, daß dies durch die Integration der proviralen DNA in das Genom der Produktionszelle hervorgerufen wurde. Die geringe aber reproduzierbare Erhöhung im Desmingehalt lassen jedoch eine weitergehende Bedeutung für den Produktionsprozeß der 4070A MLV vermuten. Unterstützt werden diese Vermutun-

gen durch Veröffentlichungen, die eine Beteiligung des Cytoskeletts am viralen Lebenszyklus von HIV-1 und die nukleinsäurebindenden Eigenschaften von Desminproteinen zum Inhalt haben [93, 127]. Es ist also denkbar, daß die Fähigkeit der Desminproteine, einzelsträngige RNA zu binden, für den Transport der viralen Genome zu den Orten des Zusammenbaus der viralen Partikel von entscheidender Bedeutung ist und die Überexpression des Desmings sicherstellen soll, daß die Zelle über ausreichend viele Desminproteine verfügt. Die Proteine der Intermediärfilamente werden laufend aus dem im Cytoplasma befindlichen Vorrat in diese Cytoskelettstrukturen eingebaut und gegen die in den Filamenten vorhandenen Proteine ausgetauscht [128]. Die Ausschaltung des Desmings, z.B. über RNAi [150], sollte zu einer Reduktion der viralen Titer führen, wenn Desmin an dem Transport der viralen RNA wesentlich beteiligt ist. Entsprechende Experimente werden in der Arbeitsgruppe zur Zeit vorbereitet.

4.8 AUSBLICK

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein kleiner Einblick in die Komplexität der Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirts-/Produktionszelle gegeben werden. Wie beeinflussen Änderungen, die Produktionszelle betreffend, die 4070A MLV's und ihre Eigenschaften? Welche Richtlinien können für die Erzeugung neuer Verpackungszelllinien gegeben werden?

Zellen, die als Verpackungszelllinien für die Produktion retroviraler Vektoren eingesetzt werden sollen, werden nach mehreren Gesichtspunkten ausgesucht. Dabei richtet sich das Hauptaugenmerk auf die Produktion hoher Titer und die Stabilität in humanem Serum. Mit den vorliegenden Ergebnissen können neue Anhaltspunkte für die Auswahl geeigneter Zelllinien gegeben werden. Für die Produktion thermisch stabilerer 4070A MLV's sind demnach Zelllinien, die über einen möglichst geringen Cholesteringehalt verfügen, besser geeignet. Desweiteren könnten Verpackungszelllinien entwickelt werden, deren Cholesteringehalt über Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese oder der Konzentration an Cholesterin im Medium gesteuert wird. Dadurch ließen sich möglicherweise gezielt thermisch stabile Viren produzieren, was für langwierige Aufarbeitungsprozesse vorteilhaft ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auch Zelllinien mit geringem Titer das Potential zur Bildung großer Mengen von 4070A MLV's besitzen. Wenn geklärt werden kann, was die hohe Anzahl nicht-infektiöser Viren verursacht, ständen damit weitere interessante Zelllinien für die Produktion retroviraler Vektoren zur Verfügung.

Neben neuen Perspektiven zur Produktion stabiler Retroviren ergeben sich aus den Ergebnissen weitere Fragestellungen zur Erforschung der Interaktionen zwischen Virus und Wirtszelle. Was ist die Ursache für die Umstrukturierungen in den Intermediärfilamenten von Produktionszellen? Sind diese notwendig für den Zusammenbau und/oder die Freisetzung der 4070A MLV's? Welche Signaltransduktionswege werden durch eine Infektion der Wirtszelle beeinflusst? Wie reagiert die Zelle auf eine virale Infektion und wie könnten diese Erkenntnisse für mögliche antivirale Therapien eingesetzt werden?

5 ANHANG

5.1 ABKÜRZUNGEN

ψ	Verpackungssignal für den MLV
$\psi+$	psi, erweitertes Verpackungssignal für den MLV
4070A MLV	amphotroper, murine leukemia virus‘
Abb.	Abbildung
ABCA1	‘ATP binding cassette transporter A1‘
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β -Gal	beta-Galactosidase
BHK21B	‘baby hamster kidney‘ Zelllinie
BHK-A	‘baby hamster kidney‘ Zelllinie
bp	Basenpaare
BSA	‘bovine serum albumin‘
CAT-1	Rezeptor für das Moloney MLV
CD4	Rezeptor für HIV
cDNA	‘complementary‘-DNA
cfu	‘colony forming units‘
CNBP	‘cellular nucleic acid binding protein‘
CoA	Coenzym A
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DME	‘Dulbeccos modified Eagle medium‘
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat

DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EcoRI	Restriktionsendonuklease aus E.coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
env	Envelope-Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein
G418	Geneticin
gag	retrovirales Gen
gfp	„green fluorescence protein“
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HDL	„high density lipoprotein“
HEBS	Puffer mit HEPES, NaCl und Na ₂ HPO ₄
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N-sulfonsäure
HindIII	Restriktionsendonuklease aus
HIV	„human immunodeficiency virus“
HMG-CoA	beta-Hydroxy-beta-methylglutaryl-CoA
HT1080	humane Fibrosarkomzelllinie
HWZ	Halbwertszeit
kb	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
LacZ	lacZ-Gen des bakteriellen lac-Operons
LB	Luria Bertani Medium
LDL	„low density lipoprotein“
LTR	„long terminal repeat“

MBCD	Methyl-beta-Cyclodextrin
MLV	‚murine leukemia virus‘
MoMLV	Moloney MLV
MoMuLV	Moloney MLV
mRNA	‚messenger‘-RNA
MS2	Bakteriophage
MTX	Methotrexat
NE	Niedrig EDTA Puffer
NIH3T3	Maus Fibroblastenzelllinie
NPC1	‚Niemann-Pick disease type C protein‘
OD	optische Dichte
PA317	amphotrope Verpackungszelllinie basierend auf NIH3T3
PB	‚primer binding site‘
PBS	‚phosphate buffered saline‘
PCR	polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Pit-2	Rezeptor für das 4070A MLV
pol	retrovirales Gen
PV	Polyvinyl
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
SCAP	‚SREBP cleavage activating protein‘
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	Medium für die Transformation von Bakterien
SOC	AusgangsmEDIUM für SOB
SREBP	sterol regulatory element binding protein

SSC	Puffer mit NaCl und NaCitrat
SU	,surface‘-Untereinheit des Envelope-Proteins
SV40	simian virus 40
Tab	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TB	Medium für Bakterien zur Plasmid-Herstellung
TBS	,Tris buffered saline‘
TE	Tris/EDTA-Puffer
TE FlyA7	amphiotrope Verpackungszelllinie, basierend auf TE671
TE671	humane Sarkomazelllinie
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin
TKM	Puffer mit Tris, KCl, MgCl ₂ , EDTA
TM	Transmembran-Untereinheit
TNE	Puffer mit Tris, NaCl, EDTA, dTT
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
U	,Unit‘, Enzym-Aktivitätseinheiten
upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-beta-D-Galaktopyranosid

5.2 PLASMIDE

pMLVDHFR*-5	kodiert für replikationskompetenten ecotropen Moloney MLV, kloniert in pBR322 (H. Stuhlmann [134])
pLEIN	retroviraler Vektor, enthält 5‘- und 3‘-LTR sowie die erweiterte Verpackungssequenz des MoMLV, das 5‘-LTR dient als Promotor für egfp- und Neomycin-Gen (Clontech)
p4070A-MLV	kodiert für replikationskompetenten amphotropen 4070A MLV, kloniert in Blueskript (O. Mertens, Généthron)

5.3 PRIMER

FPG	ATTGACTGAGTCGCCCCGG
RPG	AGCGAGACCACAAGTCGGAT
MS175	CCCTCCGTTCGCGTTTA
MS276	GTTTTGCTTTGTCACCGTGA

5.4 ANTIKÖRPER

erste Antikörper:

gegen MLV Envelope-Protein:	Ratte monoklonales IgG 83A25 (Evans et al., [86])
gegen Desmin:	Kaninchen Serum polyklonales IgG, (PROGEN) für immunhistochemische Färbungen mit Texas Rot markiert
gegen Caveolin:	Kaninchen polyklonaler Antikörper, (Becton Dickinson)

zweite Antikörper:

goat anti rat, FITC markiert (Sigma)
goat anti rabbit, POD gekoppelt (Sigma)
goat anti rat, POD gekoppelt (Sigma)

5.5 LITERATUR

- [1] ORDA reports. Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) data management report – June 1994, *Hum. Gene Ther.* 5: 1295-1302 (1994)
- [2] Andreadis S.T. et al., Large-scale processing of recombinant retroviruses for gene therapy, *Biotechnol. Prog.* 15: 1-11 (1999)
- [3] Coffin J.M., Retroviridae: The viruses and their replication, In B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley (eds), *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1996)
- [4] Nermut M.V. et al., Further evidence of icosahedral symmetry in human and simian immunodeficiency viruses, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9: 929-938 (1993)
- [5] Nermut M.V. et al., Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus, *Virology* 198: 288-296 (1994)
- [6] Fu S. et al., Site-specific phosphorylation of avian retrovirus nucleocapsid protein pp12 regulates binding to RNA, *J. Biol. Chem.* 260: 9941-9947 (1985)
- [7] Pizzato M. et al., Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction, *J. Virol.* 73: 8599-8611 (1999)
- [8] Kavanaugh et al., Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7071-7075 (1994)
- [9] Miller et al., Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 78-82 (1994)
- [10] Battini et al., Receptor-binding properties of a purified fragment of the 4070A amphotropic murine leukemia virus envelope glycoprotein, *J. Virol.* 70: 4387-4393 (1996)
- [11] McClure et al., The pH independence of mammalian retrovirus infection, *J. Gen. Virol.* 71: 767-773 (1990)
- [12] Katen et al., Infectious entry by amphotropic as well as ecotropic murine leukemia viruses occurs through an endocytic pathway, *J. Virol.* 75: 5018-26 (2001)
- [13] Coffin J.M. et al., Terminal redundancy and the origin of replication of Rous sarcoma virus RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1908-1912 (1977)

- [14] Bowerman et al., A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA, *Genes Dev.* 3: 469-478 (1989)
- [15] Roe et al., Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis, *EMBO J.* 12: 2099-2108 (1993)
- [16] Sherdin et al., Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration, *J. Virol.* 64: 907-912 (1990)
- [17] Mielke et al., Anatomy of highly expressing chromosomal sites targeted by retroviral vectors. *Biochem.* 35, 2239-2252 (1996)
- [18] Weidhaas J.B. et al., Relationship between retroviral DNA integration and gene expression, *J. Virol.* 74: 8382-8389 (2000)
- [19] Coffin et al., Structures of the retroviral genome, In Weiss R. et al. (eds), Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 261-368 (1984)
- [20] Allan D.S. et al., Endogenous murine leukemia virus DNA sequences in murine cell lines: implications for gene therapy safety testing by PCR, *Leuk Lymphoma* 23: 375-381 (1996)
- [21] Galili U. et al., Man, apes and old world monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cells, *J. Biol. Chem.* 263: 17755-17762 (1988)
- [22] Chan L.M. et al., A novel human suspension culture packaging cell line for production of high-titre retroviral vectors, *Gene Ther.* 8: 697-703 (2001)
- [23] Sheridan P.L. et al., Generation of retroviral packaging and producer cell lines for large-scale vector production and clinical application: improved safety and high titer, *Mol Ther.* 2: 262-275 (2000)
- [24] Lyddiatt A. et al., Biochemical recovery and purification of gene therapy vectors, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 177-185 (1998)
- [25] Braas G. et al., Strategies for the isolation and purification of retroviral vectors for human gene therapy, *Bioseparation* 6: 211-228 (1996)
- [26] Kaptein L.C.M. et al., Optimized conditions for the production of recombinant amphotropic retroviral vector preparations, *Gene Ther.* 4: 172-176 (1997)
- [27] Kotani H. et al., Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy, *Hum. Gene Ther.* 5: 19-28 (1994)
- [28] Paul R.W. et al., Increased viral titer through concentration of viral harvests from retroviral packaging lines, *Hum. Gene Ther.* 4: 609-615 (1993)

-
- [29] Sanes J.R. et al., Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos, *EMBO J.* 5: 3133-3142 (1986)
- [30] Legrain P. et al., Increase of retroviral infection in vitro by binding of antiretroviral antibodies, *J. Virol.* 60: 1141-1144 (1986)
- [31] Layne S.P. et al., Quantifying the infectivity of human immunodeficiency virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 4644-4648 (1989)
- [32] Forestell S.P. et al., Retroviral end-point titer is not predictive of gene transfer efficiency: implications for vector production, *Gene Ther.* 2: 723-730 (1995)
- [33] McTaggart S. et al., Effects of culture parameters on the production of retroviral vectors by a human packaging cell line, *Biotechnol. Prog.* 16: 859-865 (2000)
- [34] Olsen J.C. et al., Use of sodium butyrate to enhance production of retroviral vectors expressing CFTR cDNA, *Hum. Gene Ther.* 6: 1195-1202 (1995)
- [35] Pagès J.-C. et al., Activation of Moloney Murine Leukemia Virus LTR enhances the titer of recombinant retroviruses in Ψ CRIP packaging cells, *Gene Ther.* 2: 547-551 (1995)
- [36] Le Doux J.M. et al., Proteoglycans secreted by packaging cell lines inhibit retrovirus infection, *J. Virol.* 70: 6468-6473 (1996)
- [37] Le Doux J.M. et al., Differential inhibition of retrovirus transduction by proteoglycans and free glycosaminoglycans, *Biotechnol. Prog.* 15: 397-406 (1999)
- [38] Makino M. et al., Concentration of live retrovirus with a regenerated cellulose hollow fiber, *BMM, Arch. Virol.* 139: 87-96 (1994)
- [39] Saha K. et al., A simple method for obtaining highly viable virus from culture supernatant, *J. Virol. Methods* 46: 349-352 (1994)
- [40] Pinter A. et al., The presence of disulfide-linked gp70-p15E complexes in AKR murine leukemia virus, *Virology* 83: 417-422 (1977)
- [41] Linder M. et al., Localization of the intrachain disulfide bonds of the envelope glycoprotein 71 from Friend murine leukemia virus, *Eur. J. Biochem.* 203: 65-73 (1992)
- [42] Nihrane A. et al., Secretion of a murine retroviral Env associated with resistance to infection, *J. Gen. Virol.* 78: 785-793 (1997)
- [43] Linder M. et al., Structural elements in glycoprotein 70 from polytropic Friend mink cell focus-inducing virus and glycoprotein 71 from ecotropic Friend murine leukemia

- virus, as defined by disulfide-bonding pattern and limited proteolysis, *J. Virol.* 68: 5133-5141 (1994)
- [44] Pinter A. et al., Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol-disulfide exchange enzymes, *J. Virol.* 71: 8073-8077 (1997)
- [45] Opstelten D.-J.E. et al., Moloney murine leukemia virus envelope protein subunits, gp70 and Pr15E, form a stable disulfide-linked complex, *J. Virol.* 72: 6537-6545 (1998)
- [46] Hammerstedt M. et al., Minimal exclusion of plasma membrane proteins during retroviral envelope formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7527-7532 (2000)
- [47] Simons K. et al., How cells handle cholesterol, *Science* 290: 1721-1726 (2000)
- [48] Simons K. et al., Lipid rafts and signal transduction, *Nature Rev.* 1: 31-41 (2000)
- [49] Brown D.E. et al., Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 111-136 (1998)
- [50] Anderson R.G. et al., The caveolae membrane system, *Annu. Rev. Biochem.* 67: 199- (1998)
- [51] Okamoto T. et al., Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing „Preassembled signaling complexes“ at the plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 273: 5419-5422 (1998)
- [52] Millan J. et al., CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains; *Tissue Antigens* 53: 33-40 (1999)
- [52] Kurzchalin T.V. et al., Membrane microdomains and caveolae, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 424-431 (1999)
- [53] Simons K. et al., Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387: 569-572 (1997)
- [54] Fielding C.J. et al., Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships, *Biochim. Biophys. Acta* 1529: 210-222 (2000)
- [55] Yeagle P.L. et al., Cholesterol and the cell membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 822: 267-287 (1985)
- [56] Schroeder F. et al., Cholesterol domains in biological membranes, *Mol. Membr. Biol.* 12: 113-119 (1995)
- [57] Brown D.A. et al., Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts, *J. Biol. Chem.* 275: 17221-17224 (2000)

-
- [58] Heino S. et al., Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 8375-8380 (2000)
- [59] Liscum L. et al., Intracellular cholesterol transport, *Biochim. Biophys. Acta* 1438: 19-37 (1999)
- [60] Shiao Y.J. et al., Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of mitochondrial phosphatidylethanolamine is derived from decarboxylation of phosphatidylserine, *J. Biol. Chem.* 270: 11190-11198 (1995)
- [61] Fielding C.J. et al., Molecular physiology of reverse cholesterol transport, *J. Lipid Res.* 36: 211-228 (1995)
- [62] Neufeld E.B. et al., The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo, *J. Biol. Chem.* 274: 9627-9635 (1999)
- [63] Davies J.P. et al., Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein, *J. Biol. Chem.* 275: 24367-24374 (2000)
- [64] Higgins M.E. et al., Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network, *Mol. Genet. Metab.* 68: 1-13 (1999)
- [65] Puri V. et al., Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases, *Nature Cell. Biol.* 1: 386-388 (1999)
- [66] Keller P. et al., Post-Golgi biosynthetic trafficking, *J. Cell. Sci.* 110: 3001-3009 (1997)
- [67] van Meer G., Lipid traffic in animal cells, *Annu. Rev. Cell. Biol.* 5: 247-275 (1989)
- [68] Fielding C.J. et al., Intracellular cholesterol transport, *J. Lipid Res.* 38: 1503-1521 (1997)
- [69] Johnson W.J. et al., Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1085: 273-298 (1991)
- [70] Rothblat G.H. et al., Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights, *J. Lipid Res.* 40: 781-796 (1999)
- [71] Olofsson S.O. et al., The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins, *Curr. Opin. Lipidol.* 10: 341-346 (1999)

- [72] Dolo V. et al., Enrichment and localization of ganglioside G(D3) and caveolin-1 in shed tumor cell membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1486: 265-274 (2000)
- [73] Hamon Y. et al., ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine, *Nature Cell Biol.* 2: 399-406 (2000)
- [74] Orso E. et al., Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice, *Nature genet.* 24: 192-196 (2000)
- [75] Puri A. et al., The neutral glycosphingolipid globotriaosylceramide promotes fusion mediated by a CD4-dependent CXCR4-utilizing HIV type 1 envelope glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14435-14440 (1998)
- [76] Lu X. et al., Ecotropic murine leukemia virus receptor is physically associated with caveolin and membrane rafts, *Virology* 276: 251-258 (2000)
- [77] Scheiffele P. et al., Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain, *EMBO J.* 16: 5501-5508 (1997)
- [78] Zhang J. et al., Influenza virus assembly, and lipid raft microdomains: A role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins, *J. Virol.* 74: 4634-4644 (2000)
- [79] Scheiffele P. et al., Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 274: 2038-2044 (1999)
- [80] Manie S.N. et al., Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: A potential cellular location for virus assembly, *J. Virol.* 74: 305-311 (2000)
- [81] Nguyen D.H. et al., Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts, *J. Virol.* 74:3264-3272 (2000)
- [82] Kaerber G., Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 162: 480 (1931)
- [83] Spearman C., The method of 'right and wrong' cases ('constant stimuli') without Gauss's formular, *Brit. J. Psychol.* 2: 227 (1908)
- [84] Towers G.J. et al., One step screening of retroviral producer clones by real time quantitative PCR, *J. Gene Med.* 1: 352-359 (1999)
- [85] Müller K. et al., Real time detection of retroviruses by PCR, *J. Gene Med. Supplement to volume 1*: 46 (1999)
- [86] Evans L.H. et al., A neutralizable epitope common to the envelope glycoproteins of

- ecotropic, polytropic, xenotropic, and amphotropic murine leukemia viruses, *J Virol.* 64: 6176-6183 (1990)
- [87] Gu J.Z. et al., Substantial narrowing of the Niemann-Pick C candidate interval by yeast artificial chromosome complementation, *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 7378-7383 (1997)
- [88] Takeuchi Y. et al., Sensitization of cells and retroviruses to human serum by $\alpha(1-3)$ galactosyltransferase, *Nature* 379: 85-88 (1996)
- [89] Grabenhorst E. et al., Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(beta1-4)GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase alpha 2,6-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(beta1-4)GlcNAc(beta1-2)Man(alpha1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant beta-trace protein, *Eur. J. Biochem.* 232: 718-725 (1995)
- [90] Trono D. et al., Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses, *J Virol.* 66: 4893-4900 (1992)
- [91] Levin J.G. et al., Deficiency of 60 to 70S RNA in murine leukemia virus particles assembled in cells treated with actinomycin D, *J. Virol.* 14: 152-61 (1974)
- [92] Sharma S. et al., Noninfectious virus-like particles produced by Moloney murine leukemia virus-based retrovirus packaging cells deficient in viral envelope become infectious in the presence of lipofection reagents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10803-10808 (1997)
- [93] Karczewski M.K. et al., Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type I Vif protein, *J. Virol.* 70: 494-507 (1996)
- [94] Shoeman R.L. et al., Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6336-6340 (1990)
- [95] Gerin P.A. et al., Production of retroviral vectors for gene therapy with the human packaging cell line FLYRD18, *Biotechnol. Prog.* 15: 941-948 (1999)
- [96] Ory D.S. et al., A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11400-11406 (1996)
- [97] Cosset F.L. et al., High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum, *J. Virol.* 69: 7430-7436 (1995)

- [98] Mason J.M. et al., Expression of human bone morphogenic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair, *Gene Ther.* 5: 1098-1104 (1998)
- [99] Princen F. et al., Repeated cycles of retrovirus-mediated HSVtk gene transfer plus ganciclovir increase survival of rats with peritoneal carcinomatosis, *Gene Ther.* 5: 1054-1060 (1998)
- [100] Ryll T. et al., Production of recombinant human interleukin-2 with BHK cells in a hollow fibre and a stirred tank reactor with protein-free medium, *J. Biotechnol.* 14: 377-392 (1990)
- [101] Xiao C. et al., Pilot production of high-titer interferon and virus with a microcarrier suspension culture system, *Chin. Med. Sci. J.* 7: 67-71 (1992)
- [102] Peiwei G. et al., Experience with production of interferon and Japanese encephalitis vaccine in continuous cell lines, *Dev. Biol. Stand.* 70: 223-226 (1989)
- [103] Bierley S.T. et al., A comparison of methods for the estimation of retroviral burden, *Dev. Biol. Stand.* 88: 163-165 (1996)
- [104] Davis J.L. et al., Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies, *Hum. Gene Ther.* 8: 1459-1467 (1997)
- [105] Zavorotinskaya T. et al., Failure to cleave murine leukemia virus envelope protein does not preclude its incorporation in virions and productive virus-receptor interaction, *J. Virol.* 73: 5621-5629 (1999)
- [106] Goff S. et al., Isolation and properties of Moloney murine leukemia virus mutants: use of a rapid assay for release of virion reverse transcriptase, *J. Virol.* 38: 239-248 (1981)
- [107] LeDoux J.M. et al., Kinetics of retrovirus production and decay, *Biotechnol. Bioeng.* 63: 654-662 (1999)
- [108] Lee S.-G. et al., Optimization of environmental factors for the production and handling of recombinant retrovirus, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 477-483 (1996)
- [109] Voet D., Voet J.G., *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1992
- [110] Drobnis E.Z. et al., Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model, *J. Exp. Zool.* 265: 432-437 (1993)
- [111] Meleard P. et al., Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content, *Biophys. J.* 72: 2616-2629 (1997)

-
- [112] Poryvaev V.D. et al., The effect of conditions of storage and composition of viral material on lipid peroxidation of the viral envelope and inactivation of the influenza virus, *Vopr. Virusol.* 40: 62-65 (1995)
- [113] Poryvaev V.D. et al., Effect of components of virus-containing allantoic fluid on the stability of influenza virus during storage, *Vopr. Virusol.* 41: 126-129 (1996)
- [114] Lu Y.E. et al., Semliki forest virus budding: assay, mechanisms, and cholesterol requirement, *J. Virol.* 74: 7708-7719 (2000)
- [115] London E. et al., Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts), *Biochim. Biophys. Acta* 1508: 182-195 (2000)
- [116] Vincent S. et al., Measles virus assembly within membrane rafts, *J. Virol.* 74: 9911-9915 (2000)
- [117] Yu H. et al., Quantitation of MoMuLV envelope protein on the cell surface, *Virology* 243: 415-422 (1998)
- [118] Rouso I. et al., Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13523-13525 (2000)
- [119] Yang C. et al., Palmitoylation of the murine leukemia virus envelope glycoprotein transmembrane subunits, *Virology* 221: 87-97 (1996)
- [120] Resh M.D. et al., Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins, *Biochim. Biophys. Acta.* 1451:1-16 (1999)
- [121] Moffett S. et al., Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts, *J. Biol. Chem.* 275: 2191-2198 (2000)
- [122] Trial J. et al., Phenotypic and functional changes in peripheral blood monocytes during progression of human immunodeficiency virus infection. Effects of soluble immune complexes, cytokines, subcellular particulates from apoptotic cells, and HIV-1-encoded proteins on monocytes phagocytic function, oxidative burst, transendothelial migration, and cell surface phenotype, *J. Clin. Invest.* 95: 1690-1701 (1995)
- [123] Nemeikaite A. et al., The changes of prooxidant and antioxidant enzyme activities in bovine leukemia virus-transformed cells. Their influence on quinone cytotoxicity, *FEBS Lett.* 326: 65-68 (1993)
- [124] Geiss G.K. et al., Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays, *Virology* 266: 8-16 (2000)

- [125] Lee M.L. et al., Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9834-9839 (2000)
- [126] Coulombe P.A. et al., The ,ins‘ and ,outs‘ of intermediate filament organization, *Trends Cell Biol.* 10: 420-428 (2000)
- [127] Vorgias C.E. et al., Nucleic acid-binding activities of the intermediate filament subunit proteins desmin and glial fibrillary acidic protein, *Z. Naturforsch.* 41: 897-909 (1986)
- [128] Vikstrom K.L. et al., Steady state dynamics of intermediate filament networks, *J. Cell Biol.* 118: 121-129 (1992)
- [129] Cheeseman K.H., Mechanisms and effects of lipid peroxidation, *Mol. Aspects Med.* 14: 191-197 (1993)
- [130] Abuja P.M. et al., Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Clin. Chim. Acta* 306: 1-17 (2001)
- [131] Tirosh O. et al., Oxidative stress effect on the integrity of lipid bilayers is modulated by cholesterol level of bilayers, *Chem. Phys. Lipids* 87: 17-22 (1997)
- [132] Sevanian A. et al., Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation, *Biochim. Biophys. Acta* 961: 316-327 (1988)
- [133] Vila A. et al., Dissemination of peroxidative stress via intermembrane transfer of lipid hydroperoxides: model studies with cholesterol hydroperoxides, *Arch. Biochem. Biophys.* 380: 208-218 (2000)
- [134] Stuhlmann H. et al., Construction and properties of replication-competent murine retroviral vectors encoding methotrexate resistance, *Mol. Cell Biol.* 9:100-108 (1989)
- [135] Kitten O. et al., Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes in vivo, *Hum. Gene Ther.* 8: 1491-1494 (1997)
- [136] Hanahan D., Studies of transformation of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580 (1983)
- [137] Greener A., *Strategies* 3, 5 (1990)
- [138] Birnboim H.C. et al., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucl. Acids Res.* 1: 1513-1523 (1979)
- [139] Cruz P.E. et al., Modeling retrovirus production for gene therapy. 1. Determination of optimal bioreaction mode and harvest strategy, *Biotechnol. Prog.* 16: 213-221 (2000)
- [140] Vigh L. et al., Does the membrane’s physical state control the expression of heat shock

- and other genes?, TIBS 23: 369-374 (1998)
- [141] Incardona J.P. et al., Cholesterol in signal transduction, Curr. Opin. Cell Biol. 12: 193-203 (2000)
- [142] Pensiero M.N. et al., Development of amphotropic murine retrovirus vectors resistant to inactivation by human serum, Hum. Gene Ther. 7: 1095-1101 (1996)
- [143] Hofmann-Lehmann R. et al., Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one- versus two-enzyme systems, AIDS Res. Hum. Retroviruses 16: 1247-1257 (2000)
- [144] Schutten M. et al., Development of a real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma, J. Virol. Methods 88: 81-87 (2000)
- [145] Whitefield G.B. et al., J. Am. Chem. Soc. 77: 4799-4801 (1955)
- [146] Majuk Z. et al., Effects of filipin on the structure and biological activity of enveloped viruses, J. Virol. 24: 883-892 (1977)
- [147] Feltkamp C.A. et al., Membrane-associated proteins affect the formation of filipin-cholesterol complexes in viral membranes, Exp. Cell. Res. 140: 289-297 (1982)
- [148] Gale M. jr. et al., Translational control of viral gene expression in eukaryotes, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 239-280 (2000)
- [149] Andersen K.B. et al., Entry of murine retrovirus into mouse fibroblasts, Virology 125: 85-98 (1983)
- [150] Elbashir S.M. et al., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature 411: 494-498 (2001)
- [151] McPherson I.A. et al., Polyoma transformation of hamster cell clones- an investigation of genetic factors effecting cell competence, Virology 16: 147-151 (1962)
- [152] Rashed et al., Cancer 33: 1027-1033 (1974)

DANKSAGUNG

Bei Herrn Dr. Manfred Wirth, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit angefertigt wurde, möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung eines überaus interessanten Themas, die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die vielen konstruktiven Gespräche und Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Jürgen Bode und Herrn Prof. Jürgen Wehland danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme der Referate und Herrn Prof. Rüdiger Cerff für die Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in all den Jahren unterstützt, ermutigt und meine Interessen gefördert haben. (Auch wenn das Platzen von Tomaten nicht mein Fachgebiet ist und das Arbeiten mit unsichtbarer DNA in den Bereich der Esoterik fällt.)

Desweiteren möchte ich all meinen Freunden: Kerstin, Martin, Felix, Volker, Isabell, Mario, 2× Anja mit 2× Peter, Bronni, dem Gliesmaroder Schwimmverein mit Anja, Petra und dem Tigeresser Michael für all den schönen Freizeitstreß und das Interesse an meiner Arbeit danken.

Und keine Titerplattenschlachten und LightCycler-Orgien ohne tatkräftige Unterstützung von Katja. Vielen Dank für die Unterstützung und die Einführung in die Welt der deutschen Schlager. Frau Dr. Wiebke Hansen möchte ich für die schöne gemeinsame Doktoranden- und Ex-Mitdoktoranden-Zeit sowie für die vielen Anregungen und Tips danken, Papierknubbel inklusive. Bei Petra, Anika und Jingxiu möchte ich mich für die nette Zeit, die Kaffeepausen (five minutes later...) und ihre Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. Jo Lauber danke ich für seine vorbehaltlose Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Auswertung der Microarrays (in jedem macro steckt auch ein micro ☺).

Maria Höxter danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der FACS-Analysen.